

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

DETERMINACION DE PODER MUTAGENICO
DE DISTINTAS SUSTANCIAS

DONACION.....
A.....
Fecha... 23 - 06 - 99...
Inv. B..... Inv..... B. 56... 112

Tesis No. 136

TESIS
MARIA MERCEDES LOJO
1982

a mi padre

*que me enseñó a amar
y respetar al trabajo*

Mi reconocimiento

a la Facultad de Ciencias Exactas por haberme incorporado a sus claustros y por los recursos insumidos en la realización de este trabajo;

a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires por las becas de iniciación otorgadas.

Mi agradecimiento

al Doctor Oscar Grau por haberme brindado la oportunidad de iniciarme en la investigación, por su dirección durante el desarrollo, discusión y corrección del trabajo;

a mis compañeros y personal del Laboratorio de Química Biológica por su colaboración y amistad;

al Doctor Gabriel Favelukes por los valiosos comentarios y críticas formulados sobre el borrador del presente trabajo;

a la Dra. Marta Salseduc por la colaboración brindada;

a mi esposo, por haber contribuído con su apoyo y estímulo a la concreción de este trabajo.

El presente trabajo de tesis para
optar al grado de
Doctor en Ciencias Bioquímicas
ha sido realizado
en el Laboratorio de Química Biológica
de la Facultad de Ciencias Exactas,
bajo la dirección
del Profesor Doctor Oscar Grau

INDICE

| | Página |
|--|--------|
| Indice de figuras, esquemas y tablas | vii |
| Abreviaturas y símbolos | ix |
| PRESENTACIÓN | xi |
| INTRODUCCIÓN | |
| AGENTES MUTAGÉNICOS Y CARCINOGENÉTICOS | 1 |
| 1. AGENTES NATURALES | 1 |
| 2. PRODUCTOS SINTÉTICOS | 2 |
| 3. INTERACCION DE LAS DROGAS CON EL MATERIAL GENETICO | 3 |
| DETECCIÓN DE PODER MUTAGÉNICO: SU IMPORTANCIA EN LA PRESELECCION DE SUSTANCIAS PROBABLEMENTE MUTAGÉNICAS | 5 |
| 1. ENSAYO EMPLEANDO BACTERIAS | 5 |
| Test de reparación | 5 |
| Test de mutación en bacterias | 6 |
| Test de fluctuación | 6 |
| 2. ENSAYOS EMPLEANDO FAGOS | 7 |
| Inductest | 7 |
| Inducción de mutación en fagos | 8 |
| 3. ENSAYOS EMPLEANDO SISTEMAS EUCARIOTES | 8 |
| Test de mutación | 8 |
| Test de reparación | 9 |
| 4. TEST "IN VIVO" | 9 |
| Test de micronúcleos | 9 |
| Estudios citogenéticos | 10 |
| Traslocaciones cromosómicas hereditarias | 10 |
| Mutantes letales condicionales ligados al sexo | 11 |
| DETOXIFICACIÓN DE LAS DROGAS | 13 |
| 1. EXTRACTO MICROSOMICO DE HIGADO DE RATA | 13 |

| | Página |
|---|--------|
| Modificación de los niveles enzimáticos por las sustancias inductoras | 14 |
| Sistemas enzimáticos antagónicos: su influencia en la respuesta obtenida | 16 |
| Limitaciones del extracto para reproducir el metabolismo "in vivo" | 17 |
| 2. OTRAS VIAS DE DETOXIFICACION | 18 |
| LAS BACTERIAS COMO INDICADORAS DEL IMPACTO MUTAGÉNICO . | 20 |
| 1. MECANISMOS DE REPARACION DEL DAÑO GENETICO Y SU RELACION CON EL TEST DE AMES | 20 |
| 2. MECANISMOS DE MUTACION EN BACTERIAS Y SU RELACION CON EL TEST DE AMES | 21 |
| 3. EXPRESION FENOTIPICA DE LAS MUTACIONES | 24 |
| EL TEST DE AMES: CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS BACTERIANAS EMPLEADAS | 26 |
| Cepa TA1537 | 26 |
| Cepa TA1538 | 26 |
| Cepa TA1535 | 28 |
| Cepa TA100 | 28 |
| Cepa TA98 | 28 |
| 1. MUTACIONES ADICIONALES QUE INCREMENTAN LA RESPUESTA DE LAS CEPAS | 29 |
| 2. EL PLASMIDO PKM101 Y SU IMPORTANCIA EN EL INCREMENTO DE LA RESPUESTA MUTAGENICA DE LAS CEPAS | 29 |
| Efecto de PKM101 sobre la respuesta de la cepa TA1535 | 31 |
| Efecto del plásmido PKM101 sobre la cepa TA1538 | 32 |
| MATERIALES Y MÉTODOS | |
| MATERIALES | 33 |
| 1. DROGAS ENSAYADAS | 33 |
| 2. MEDIOS DE CULTIVO | 34 |
| Caldo de cultivo (NB) | 34 |

| | Página |
|--|--------|
| Medio Vogel-Bonner "E" (50X) | 34 |
| Medio mínimo para cajas (MM) | 34 |
| Agar blando | 34 |
| a) Medio selectivo de Ames (MMA) | 34 |
| b) Medio completo (MMHB) | 34 |
| c) Medio selectivo para bacterias His ⁺ (MMB) | 34 |
| Diluyente | 34 |
| MÉTODOS | 35 |
| 1. EXTRACTO MICROSOMICO DE HIGADO DE RATA | 35 |
| Inducción de los animales | 35 |
| a) Inducción con Aroclor | 35 |
| b) Inducción con fenobarbital | 35 |
| c) Inducción con ácido níflúmico | 35 |
| d) Animales sin tratamiento | 35 |
| Preparación del homogenado | 35 |
| Preparación del S-9 Mix | 36 |
| 2. CONTROL DE LOS FENOTIPOS DE LAS CEPAS | 36 |
| Prueba de sensibilidad al cristal violeta | 36 |
| Sensibilidad a la radiación U.V. | 37 |
| Resistencia a la ampicilina | 37 |
| 3. METODO DE AMES PARA LA DETERMINACION DE PODER MUTAGENICO | 37 |
| Revertantes por caja | 37 |
| Unidades formadoras de colonia en presencia de droga | 38 |
| 4. DETERMINACION DE PODER MUTAGENICO EN MEDIO LIQUIDO | 38 |
| 5. ESTUDIO DE LA DETOXIFICACION DEL MEDIO POR LAS BACTERIAS | 40 |

RESULTADOS

CAPÍTULO I: PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO 41

1. TIPIFICACION DE LAS CEPAS 41

 Control del carácter altamente rugoso 41

 Control de sensibilidad a la radiación U.V. 41

 Control de la resistencia a la ampicilina 41

2. PREPARACION DEL EXTRACTO MICROSOMICO Y DETERMINACION DEL NIVEL ENZIMATICO DEL MISMO 42

3. REPRODUCCION DE LAS CURVAS DOSIS-RESPUESTA TOMADAS DE LA BIBLIOGRAFIA 44

4. CONCLUSIONES 52

CAPÍTULO II: APLICACIÓN DEL MÉTODO AL ESTUDIO DE LA FTALIDA DEL ÁCIDO NIFLÚMICO Y DEL ÁCIDO NIFLÚMICO 53

1. COMPORTAMIENTO DE LA FTALIDA DEL ACIDO NIFLUMICO 53

2. COMPORTAMIENTO DEL ACIDO NIFLUMICO 56

3. ANALISIS ESTADISTICO 58

4. RESPUESTA DE LA CEPA TA1535 AL AN AL CORREGIR POR MUERTE LOS RESULTADOS 60

5. CONCLUSIONES 63

CAPÍTULO III: BÚSQUEDA DE CONDICIONES PARA INCREMENTAR LA SENSIBILIDAD DE LA RESPUESTA EN EL MÉTODO DE AMES 64

1. ESTADO DE CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS 64

2. INFLUENCIA DEL SISTEMA DE DETOXIFICACION 68

 Determinación del comportamiento de varios S-9 con el mutágeno bromuro de etidio 69

 Estudio de la influencia de los distintos S-9 en la respuesta de la cepa TA1535 al ácido níflúmico 69

| | Página |
|---|---------|
| 3. CONCLUSIONES | 73 |
| CAPÍTULO IV: DETERMINACIÓN DE PODER MUTAGÉNICO EN MEDIO LÍQUIDO | 75 |
| 1. ENSAYO EN MEDIO LIQUIDO | 78 |
| Comportamiento de la MNNG en medio líquido | 79 |
| El ácido niflúmico y la cepa TA1535: una res- puesta particular. | 81 |
| A) El ácido niflúmico como droga tóxica para el sistema | 81 |
| B) El ácido niflúmico como droga detoxificable por el sistema | 90 |
| 2. CONCLUSIONES | 95 |
| DISCUSIÓN | |
| EFFECTO TÓXICO, EFFECTO MUTAGÉNICO Y CORRECCIÓN POR MUERTE | 96 |
| 1. INFLUENCIA DE LA FRECUENCIA DE MUTACION EN LA APARICION DE COLONIAS His ⁺ EN LA CAJA | 97 |
| 2. ENSAYOS CUANTITATIVOS: PREINCUBACION DROGA- BACTERIA EN MEDIO LIQUIDO | 98 |
| 3. INDUCCION DE LAS MUTACIONES Y SU EXPRESION FENOTIPICA | 99 |
| 4. IMPACTO MUTAGENICO Y LETALIDAD | 100 |
| 5. GENOTOXICIDAD Y MUTAGENESIS | 102 |
| EL ENSAYO DE MUTAGÉNESIS EN MEDIO LÍQUIDO: EVALUA- CIÓN SIMULTÁNEA DE TOXICIDAD Y PODER MUTAGÉNICO | 104 |
| 1. EFFECTO MUTAGENICO DE MNNG SOBRE LA CEPA TA1535 | 105 |
| 2. EFFECTO DEL ACIDO NIFLUMICO SOBRE LA CEPA TA1535 | 106 |
| Efecto sobre las bacterias totales | 107 |
| Efecto del ácido niflúmico sobre las bacterias His ⁺ | 109 |
| DETOXIFICACIÓN DEL ÁCIDO NIFLÚMICO | 111 |

| | Página |
|---|--------|
| 1. DETOXIFICACION "IN VIVO" DEL ACIDO NIFLUMICO POR LAS BACTERIAS | 111 |
| 2. DETOXIFICACION "IN VITRO" DEL ACIDO NIFLUMICO POR EL EXTRACTO MICROSOMICO | 115 |
| CONCLUSIONES | 117 |
| BIBLIOGRAFÍA | 119 |

INDICE DE FIGURAS, ESQUEMA Y TABLAS

| | Página |
|---|--------|
| Figura 1: Determinación de la cantidad óptima del extracto S-9 por mililitro de S-9 Mix | 43 |
| Figura 2: Variación de la respuesta de la cepa TA1538 frente a 150 µg de bencidina, con la concentración de NADP en el S-9 Mix | 45 |
| Figura 3: Curvas dosis-respuesta para las cepas TA1535 y TA1538 con el mutágeno MNNG | 46 |
| Figura 4: Curvas dosis-respuesta para la cepa TA100 y los mutágenos aflatoxina B ₁ y benzopireno | 50 |
| Figura 5: Curvas dosis-respuesta para la cepa TA98 con los mutágenos benzopireno y bromuro de etidio | 51 |
| Figura 6: Efecto de tres tipos diferentes de extractos microsómicos en la detoxificación del bromuro de etidio | 70 |
| Figura 7: Respuesta de la cepa TA1535 frente a 800 µg por caja de ácido niflúmico empleando 3 tipos diferentes de extracto microsómico en la detoxificación | 72 |
| Figura 8: Respuesta de la cepa TA1535 a 1 µg/ml de MNNG en medio líquido | 80 |
| Figura 9: Estudio de la viabilidad de la cepa TA1535 en medio líquido frente a 400 µg por mililitro de ácido niflúmico | 82 |
| Figura 10: Estudio de la viabilidad de la cepa TA1535 en medio líquido cuando las bacterias se encuentran en una situación metabólica desfavorable | 84 |
| Figura 11: Estudio del desarrollo de la cepa TA1535 en presencia de ácido niflúmico y la influencia del número inicial de bacterias | 86 |
| Figura 12: Desarrollo de las revertantes His ⁺ de la cepa TA1535 en medio líquido frente a 400 µg por mililitro de ácido niflúmico | 89 |
| Figura 13: Efecto del medio proveniente de un cultivo de la cepa TA1535 crecido en presencia de ácido niflúmico sobre un nuevo inóculo de dicha cepa | 92 |
| Figura 14: Efecto del medio proveniente de un cultivo de la cepa TA1535 incapaz de crecer en presencia de ácido niflúmico sobre un nuevo inóculo | 94 |

| | | |
|------------|---|----|
| Esquema 1: | Determinación de poder mutagénico en medio líquido | 39 |
| Tabla 1 : | Genotipo de las cepas usadas en el test de Ames | 27 |
| Tabla 2 : | Revertantes de la cepa TA1537 frente al mutágeno MNNG | 48 |
| Tabla 3 : | Revertantes de la cepa TA100 frente al mutágeno MNNG | 49 |
| Tabla 4 : | Dosaje del poder mutagénico de la ftalida del ácido niflúmico | 54 |
| Tabla 5 : | Análisis estadístico de los resultados obtenidos en el estudio del comportamiento de la ftalida del ácido niflúmico | 55 |
| Tabla 6 : | Determinación de poder mutagénico para 500 µg por caja de ácido niflúmico | 57 |
| Tabla 7 : | Análisis estadístico de los resultados obtenidos en el estudio del comportamiento del ácido niflúmico | 59 |
| Tabla 8 : | Dosaje del poder mutagénico del ácido niflúmico con la cepa TA1535 aplicando la corrección por muerte | 62 |
| Tabla 9 : | Letalidad del ácido niflúmico para la cepa TA1535 según el estado de crecimiento del cultivo | 66 |
| Tabla 10 : | Determinación del comportamiento de la cepa TA1535 frente a 500 y 800 µg de ácido niflúmico por caja | 67 |
| Tabla 11 : | Influencia del número inicial de bacterias inoculadas en el número de revertantes obtenidas en el medio selectivo de Ames | 77 |
| Tabla 12 : | Viabilidad de la cepa TA1535 crecida y titulada en ácido niflúmico | 87 |

ABREVIATURAS Y SIMBOLOS

| | |
|---------------------|--|
| A | adenina |
| AAF | 2-acetil-aminofluoreno |
| AN | ácido niflúmico |
| C | citocina |
| CL | límite de confianza para la diferencia de dos valores medios |
| DMSO | dimetil-sulfóxido |
| D.O. | densidad óptica |
| D.O. ₅₀₀ | densidad óptica ($\lambda = 500 \text{ nm}$) |
| EES | etil-etano-sulfonato |
| FA | filtrado de un cultivo crecido en presencia de ácido niflúmico |
| FAN | ftalida del ácido niflúmico |
| F.C. | factor de corrección |
| <u>FC</u> | filtrado de un cultivo control |
| <u>FC + AN</u> | filtrado de un cultivo control con 400 $\mu\text{g/ml}$ de ácido niflúmico |
| x g | aceleración de la gravedad |
| G | guanina |
| G-6-P | glucosa-6-fosfato |
| HAP | hidrocarburos aromáticos policíclicos |
| MM | medio mínimo |
| MMA | medio selectivo de Ames |
| MMB | medio mínimo con Biotina |
| MMHB | medio mínimo completo para las cepas de Ames |
| MMHB (l) | medio mínimo completo para las cepas de Ames (líquido) |
| MMS | metil-metano-sulfonato |
| MNNG | N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina |
| NADP | nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato |
| NADPH | nicotinamida-adenina-dinucleótido fosfato (reducido) |
| NB | caldo nutritivo |

r.p.m. revoluciones por minuto

S-9 fracción post-mitocondrial del homogenado de hígado de rata

S-9_A extracto obtenido de animales tratados con Aroclor 1254

S-9_F extracto obtenido de animales tratados con fenobarbital

S-9_N extracto obtenido de animales tratados con ácido niflúmico

S-9₋ extracto obtenido de animales sin tratar

S-9 Mix Mezcla enzimática para la detoxificación "in vitro"

T timina

U.F.C. unidades formadoras de colonia

PRESENTACIÓN

El método de Ames es quizás el más difundido de los ensayos para detectar en forma rápida y económica el poder mutagénico de diversas sustancias. El motivo del presente trabajo fue aplicar este método al estudio de drogas no probadas.

Como se describe en el Capítulo I, en un primer momento empleamos mutágenos conocidos para hallar las condiciones que hicieran a nuestros resultados comparables con los publicados por otros autores. Una vez puesto a punto el método, empleamos el mismo para estudiar el poder mutagénico de la ftalida del ácido niflúmico y del ácido niflúmico.

Tal como se pone de manifiesto en los resultados presentados en el Capítulo II, la ftalida del ácido niflúmico no mostró efecto mutagénico. Sin embargo, la toxicidad que mostró el ácido niflúmico para la cepa TA1535 sugirió la posibilidad de que el efecto tóxico pudiera enmascarar al efecto mutagénico. Decidimos por esto, corregir por letalidad los revertantes obtenidos. Bajo este punto de vista la droga se presentó como un caso límite de comportamiento mutagénico. Tratamos entonces de ajustar algunas variables no controladas en el método original, que podrían influir en la sensibilidad y reproducibilidad de los datos obtenidos.

De esta manera, y como se describe en el Capítulo III, logramos sensibilizar la respuesta del sistema en lo que hace a la toxicidad de la droga, pero aún en estas condiciones no pudimos extraer conclusiones sobre su poder mutagénico.

Como describimos en el Capítulo IV, al diseñar el ensayo de mutagénesis en medio líquido logramos evaluar en forma independiente el efecto tóxico y la capacidad para producir mutagénesis. Comprobamos de esta forma que la droga no mostraba propiedades mutagénicas. El empleo de este ensayo nos permitió además conocer la cinética de inactivación de las bacterias y la aparición de mutantes. Por otra parte, permitió establecer que las bacterias detoxifican a la droga y que esta actividad depende de su estado metabólico.

I N T R O D U C C I O N

AGENTES MUTAGENICOS Y CARCINOGENICOS

La industria moderna ha aportado numerosas sustancias mutagénicas y/o carcinogénicas al medio ambiente pero también la naturaleza ha creado sustancias de este tipo. Estas sustancias se pueden encontrar en hongos y en microorganismos.

Los términos mutágeno ambiental y carcinógeno ambiental abarcan una amplia gama de sustancias cuyas actividades podrían catalogarse desde muy débiles hasta muy potentes, de manera que la cuantificación de la actividad es especialmente importante.

1. AGENTES NATURALES

Dentro del grupo de los agentes mutagénicos naturales se encuentra la aflatoxina B₁, producto metabólico de algunos hongos, que es uno de los mutágenos más potentes que se conocen (McCann, J. y colaboradores, 1975a). Por otra parte, esta sustancia ocupa también uno de los primeros lugares en cuanto a su poder carcinogénico, en los ensayos con animales (Butler, W.H. y colaboradores, 1969; Wogan, G.N. y colaboradores, 1971).

Otro ejemplo lo constituyen la sterigmatocystina y el versicolorín A, que es el intermediario metabólico de la biosíntesis de aflatoxina en algunos hongos. Estas dos sustancias se consideran como agentes mutagénicos fuertes, siendo la actividad específica para el test de Ames de la sterigmatocystina, el doble de la que corresponde al versicolorin (Wong, J.J. y colaboradores, 1977).

También en los vegetales se han aislado sustancias de este tipo. Tal es el caso de algunos flavonoides (Bjeldanes, L.F. y Chang, Y., 1977) y el de la hidrazina. En este último ejemplo se ha demostrado comportamiento mutagénico y carcinogénico (McCann, J. y colaboradores, 1975b).

En el producto de pirólisis de algunas proteínas presentes en la carne y el pescado asado ha sido posible demostrar comportamiento mutagénico (Commoner, M. y colaboradores, 1978), pero sin embargo, aparece como muy remota la posibilidad de que esta característica pueda relacionarse con la inducción de cáncer (Sugimura, T., 1978).

2. PRODUCTOS SINTETICOS

A partir del descubrimiento de la hepatotoxicidad y hepatocarcinogénesis de la N,N'-dimetilnitrosamina, se han detectado numerosos nitrosoderivados carcinogénicos (Nagao, M. y colaboradores, 1978), como por ejemplo las nitrosaminas y compuestos derivados (Lee, K. y colaboradores, 1977).

Los compuestos N-nitroso, se forman por reacción de los nitritos con otras sustancias que contienen nitrógeno, como amins y amidas. Este fenómeno se podría relacionar con el aumento del poder mutagénico del humo del cigarrillo, encontrado por Mizusaki, S. y colaboradores (1977), en relación al contenido en nitratos del tabaco.

Un gran número de nitrofuranos empleados en aditivos alimentarios y en medicinas, han dado respuesta positiva en los test de mutagénesis así como también en los ensayos de carcinogénesis en animales (Yahagi, T. y colaboradores, 1974).

Dentro de los productos de uso medicinal, la lista es amplia y aumenta gradualmente lo que es un llamado de atención contra el uso indiscriminado de drogas terapéuticas (Doll, R., 1977).

Como ya hemos mencionado, se ha encontrado comportamiento mutagénico para varias drogas antitumorales tales como la Dauromicina y la Mitomicina C (Seino, Y. y colaboradores, 1978) o los análogos de bases, tales como la 2-aminopurina (Schmid, W., 1975;

Janion, C. y Myszkowska, K., 1981).

De igual forma en algunas drogas antiparasitarias de uso masivo se ha reportado este tipo de comportamiento: la Hicantona y el Furanopromidium, usados para combatir la Schistosomiasis, dan resultados positivos en *Salmonella typhimurium* (Hartman, P.E. y colaboradores, 1971; Tong-man, O. y colaboradores, 1977).

Los pesticidas forman también un grupo importante de sustancias mutagénicas, que son además probadamente carcinogénicas y teratogénicas. El uso continuo de estas sustancias y su difusión significa un riesgo para el hombre, que se encuentra continuamente expuesto en las contaminaciones de los alimentos.

Para terminar esta breve reseña, diremos que también se ha estudiado el poder mutagénico en poluciones ambientales, realizándose extracciones con solventes a partir de filtros de aire. Así se detectó comportamiento mutagénico en el aire, para el sistema de Ames, en la localidad industrial de Fukota (Tokiwa, H. y colaboradores, 1977). Recientemente dentro de estos contaminantes se han identificado varios nitroderivados de hidrocarburos aromáticos policíclicos (HAP), que son mutagénicos aún sin detoxificación (Tokiwa, H. y colaboradores, 1981).

3. INTERACCION DE LAS DROGAS CON EL MATERIAL GENETICO

Existen evidencias experimentales que relacionan la actividad carcinogénica de las sustancias químicas con su capacidad para convertirse en sustancias electrofílicas. En este sentido se encuentra correlación con la capacidad mutagénica (Stolz, D.R. y colaboradores, 1974).

Tal es el caso, por ejemplo, del 2-acetil-aminofluoreno (AAF). Esta droga, al igual que muchas arilaminas carcinogénicas, debe ser metabolizada para manifestar su actividad (Weisburger, J.A.

y Weisburger, E.K., 1973). La N-hidroxilación de esta droga por el hígado de los roedores "in vivo" e "in vitro" la transforman en el potente carcinógeno N-hidroxil-2-aminofluoreno (Wendel, L. N. y Snorri, S.T., 1976). Para este ejemplo en base a observaciones experimentales se ha propuesto la formación de un radical libre como intermediario metabólico (Foyd, R.A. y Soong, L.M., 1977).

En el caso de los hidrocarburos aromáticos policíclicos, la formación de diolepóxidos vecinales aparece como un proceso de suma importancia en la activación metabólica (Sims, P. y colaboradores, 1974; Barscht, H., 1976). Cuando para la detoxificación del 7-metilbenzantraceno se emplea en el pool enzimático un inhibidor de la enzima epoxihidratasa, ocurre un marcado aumento de la respuesta mutagénica inducida por esta droga (Malaveille, C.B. y colaboradores, 1977). De esta manera al bloquear la enzima responsable de la hidrólisis de la unión epóxido, la mutagénesis aumenta, confirmando la relación que existe entre la presencia de este tipo de enlace y el poder mutagénico.

Newbold, R.F. y Brookes, P. (1976), al realizar estudios de mutagénesis con benzopireno, en cultivos de tejidos, identificaron la formación de compuestos hidrocarburo-DNA semejantes a los observados "in vivo" bajo las condiciones de tumorgénesis.

En todos estos ejemplos el común denominador es la formación, como intermediario activo, de una sustancia electrofílica. La avidez de estas sustancias por compuestos nucleofílicos, como los ácidos nucleicos del DNA o las proteínas, hace que la reacción se vea así favorecida desencadenando de esta forma el proceso de mutagénesis.

DETECCION DE PODER MUTAGENICO; SU IMPORTANCIA EN LA PRESELECCION DE SUSTANCIAS PROBABLEMENTE MUTAGENICAS

En los últimos diez años ha cobrado importancia el empleo de los ensayos de detección de poder mutagénico. Estos permiten una selección rápida y con bajo costo de las sustancias probablemente carcinogénicas, para su posterior estudio en animales.

Como aval para el empleo de estas determinaciones la convergencia del comportamiento mutagénico y carcinogénico, ha sido bien documentada por McCann, J. y colaboradores (1975b, 1976), Purchase, I.F. H. y colaboradores (1976), de Serres, F.J. (1976) y más recientemente por Rinkus, S.J. y Legator, M.S. (1979) y Glatt, H.R. y colaboradores (1979b).

Muchos y muy variados sistemas biológicos se emplean en este momento para la detección de sustancias mutagénicas. En este punto describiremos en forma general algunos de ellos para ocuparnos del test de Ames en particular más adelante.

1. ENSAYOS EMPLEANDO BACTERIAS

Test de reparación

Este ensayo, descrito por Slater, E.E. y colaboradores (1971), utiliza la cepa de *Escherichia coli* W3110 (Pol A⁺) y una cepa mutante derivada que es deficiente en la DNA polimerasa I.

Las bacterias se siembran en placas y se coloca la droga en la zona central. Por comparación del área de inhibición se puede determinar cualitativamente cuando una sustancia actúa dañando al material genético. En este caso el diámetro de muerte para la cepa Pol A⁻ será mayor.

Tatsumi, K. y Nishioka, H. (1977) realizan el ensayo

semicuantitativo incubando la cepa de *Escherichia coli* K12 salvaje y la doble mutante correspondiente $uvr A^-$ y $rec A^-$ con la droga durante cuatro horas. Entre los dos cultivos se determina la diferencia de desarrollo midiendo la D.O. en ambos.

Kada, T. y colaboradores (1972) proponen el uso de la cepa de *Bacillus subtilis* $rec A^-$ para comparar la inhibición del crecimiento con respecto al de la cepa salvaje. Con este método se demostró que compuestos metálicos tales como $Cr_2O_7K_2$ y $MoO_4(NH_4)_2$ inhibían preferentemente el desarrollo de la cepa $rec A^-$ (Nishio-ka, T., 1975).

Test de mutación en bacterias

Dentro de este grupo el ensayo más difundido es el de Ames, que estudia la inducción de mutaciones capaces de revertir al fenotipo salvaje 5 cepas de *Salmonella typhimurium* His^- . Más adelante discutiremos en profundidad la validez y el alcance de este método.

En forma semejante, es decir midiendo la reversión de las mutaciones en presencia de droga, se emplean otras cepas mutantes: *E. coli* WP2 Trp^- (Green, M.H. y Muriel, W.J., 1976) o de *Bacillus subtilis* His^- (Tanooka, H., 1977), siendo éstas al igual que las cepas de Ames, deficientes en el sistema de reparación por escisión.

Test de fluctuación

Basado en la experiencia clásica de Luria, S.E. y Delbrück, M. (1943), se estudia la frecuencia de mutación en cultivos individuales lo que permite determinar si la droga en estudio es capaz de modificar la frecuencia de mutación espontánea.

Después del tratamiento con la droga se fraccionan las bacterias en cultivos individuales para estudiar el crecimiento de los protótrofos en el medio de fluctuación. Los resultados se comparan con los controles en los que la variación se debe exclusivamente a la reversión espontánea.

Como indicador del desarrollo se usa el colorante azul de bromo cresol. Los cultivos individuales en los que se observa crecimiento de protótrofos aparecen turbios y amarillos (después de 72 horas de incubación), y los no crecidos se ven claros y rojos (Levin, D.E. y colaboradores, 1981).

De esta forma usando la cepa de *Klebsiella pneumoniae* para el estudio de la frecuencia de mutación, sobre 45 epóxidos probados, 36 dan diferencias significativas con respecto al control (Woogd, C.E. y colaboradores, 1981).

También por esta vía demuestra Haveland Smith, R.V. (1981) la ausencia de genotoxicidad de algunos colorantes de alimentos.

2. ENSAYOS EMPLEANDO FAGOS

Inductest

Esta técnica desarrollada por Moreau, P. y colaboradores (1976) utiliza una cepa de *E. coli* K12 lisogénica para el fago λ y estudia la inducción del mismo por las drogas ensayadas. Se ha encontrado una buena relación entre la actividad carcinogénica de muchas drogas y su capacidad para inducir el fago (Devoret, R., 1976). Este método ha sido modificado midiendo colorimétricamente la actividad de las enzimas β -galactosidasa o galactokinasa como indicadores de la inducción lisogénica (Levine, A. y colaboradores, 1978).

Wheeler, L. y colaboradores (1981) proponen el uso del

"inductest" con las cepas de Ames (*Salmonella typhimurium* His⁻). Estas cepas llevan los profagos Fels1 y Fels2 y la inducción de los mismos resulta positiva en el ensayo de algunos carcinógenos como Mitomicina C y Bleomicina, que no pueden detectarse por medida de la reversión de estas cepas.

Inducción de mutación en fagos

En este método propuesto por Hsu, W.T. y colaboradores (1965) se estudia la disminución de la infectividad en fagos tratados con la droga. Los fagos empleados (ØX174 o MS2) se tratan con la droga en estudio y se prepara a partir de ellos ácido nucleico infectivo. Este DNA se incuba con esferoplastos de *E. coli* y se determina el rendimiento obtenido en la infección.

Se ha encontrado muy buena correlación entre la carcinogénesis de muchos hidrocarburos aromáticos policíclicos y su capacidad para inhibir la infectividad de los fagos (Hsu, W.T. y colaboradores, 1977).

3. ENSAYOS EMPLEANDO SISTEMAS EUCARIOTES

Test de mutación

Se estudian las mutaciones inducidas en cultivos de células eucariotes. Huberman, E. y Sachs, L. (1976) proponen el estudio de tres marcadores genéticos en cultivos de Hamster Chino: (a) la inducción de la mutación de membrana caracterizada por la resistencia a la ouabaína, (b) alteración de la síntesis de ácidos nucleicos (por resistencia a 8-azaguanina) y (c) la mutación a nivel de síntesis de proteínas en células con leucil-tRNA sintetasa sensible a la temperatura. Para la detoxificación "in vitro" de las drogas se propone el uso de células letalmente

irradiadas.

Test de reparación

Considerando las lesiones originadas en el material genético por las sustancias mutagénicas varios autores han propuesto el estudio de la síntesis reparadora del DNA, en cultivos de células expuestas a la acción de las drogas.

Williams, G.M. y colaboradores (1977, 1980) proponen el estudio del poder mutagénico determinando la síntesis no programada de DNA, por métodos autorradiográficos. Al emplear cultivos de hepatocitos primarios, se cuenta con un sistema de detoxificación por células enteras. Los gránulos de timina tritiada en la autorradiografía expresados por núcleo celular, son una medida del daño ocasionado por la droga al material genético.

Painter, R.B. (1977), por otra parte, propone el uso de cultivos de células HeLa, midiendo el daño por la disminución en la incorporación de timina tritiada. Dado que una respuesta temprana a las lesiones en el material genético es la interrupción de la síntesis del DNA, se toma como medida del poder mutagénico la disminución en la incorporación de timina tritiada.

4. TEST "IN VIVO"

Test de micronúcleos

Se realizan estudios citológicos en la médula ósea de animales expuestos a la droga en estudio. Se toma como índice del poder mutagénico el incremento en el número de micronúcleos en eritrocitos policromatófilos. La lectura se realiza microscópicamente sobre extendidos en metafase cromosómica (Schmid, W., 1975). La fracción de células micronucleadas se expresa como porcentaje,

tomando como cien por cien al total de eritroblastos computados en el campo estudiado.

Este método pone de manifiesto no sólo la pérdida de cromatina en la segregación cromosómica, sino que permite también sacar conclusiones importantes sobre el tiempo específico de acción de las drogas en el ciclo celular (Maier, P. y Schmid, W., 1976).

Estudios citogenéticos

Se realiza el estudio de aberraciones cromosómicas inducidas por la droga en estudio (huecos, roturas, deleciones) en preparados de células en metafase.

Algunos autores proponen el pretratamiento de animales con el mutágeno y el estudio citogenético posterior de los fibroblastos obtenidos de los mismos (Basler, A. y colaboradores, 1977).

En este grupo de ensayos podemos incluir el estudio de la inducción por las drogas del intercambio de cromátidas hermanas en las células. En este método se emplea una tinción cromosómica especial (bandeo G), que realza este tipo de aberración cromosómica.

En estos dos métodos se establece como cuantificación, el número de aberraciones encontradas, sobre un total de 100 metafases analizadas.

Se ha propuesto también realizar este tipo de estudios en cultivos celulares expuestos a las drogas (Korbelik, M. y Horvat, D., 1980) con resultados satisfactorios en sustancias probadamente mutagénicas.

Traslocaciones cromosómicas hereditarias

La traslocación cromosómica en individuos heterocigotas provoca la formación de dos tipos de gametas: balanceadas y no

balanceadas. Estas últimas afectan directamente la fertilidad. Basándose en estos conceptos Generoso, W.M. y colaboradores (1977) proponen, como método para detectar comportamiento mutagénico, el estudio de las traslocaciones en ratones machos tratados con la droga en estudio. Cuando se inducen este tipo de alteraciones, se pierde más del 50% de la fertilidad y, por otro lado, la presencia de cromosomas no balanceados se pone de manifiesto en un incremento en el número de implantes embrionarios muertos. El método propone el tratamiento de los machos y, después del apareamiento, el recuento directo de los implantes abortivos en el útero de las hembras así fecundadas.

Mutantes letales condicionales ligados al sexo:

El test más difundido en este grupo es el que emplea como blanco a la mosca de la fruta, *Drosophila melanogaster*. En este ensayo se computan las mutaciones letales recesivas ligadas al cromosoma X.

Para esto se tratan los machos con la droga en estudio y posteriormente se los cruza con hembras vírgenes. En la progenie se analiza la aparición de daños letales ligados al sexo en la generaciones F_2 y F_3 , que se expresan sobre el total de hembras obtenidas en cada camada (King, M.T. y colaboradores, 1979).

Todos los ensayos descriptos presentan sus limitaciones en la evaluación del riesgo de contraer cáncer en las poblaciones expuestas, ya que los factores que determinan el desarrollo de esta enfermedad "in vivo" no pueden reproducirse en los ensayos "in vitro".

Como diferencia importante entre ambos sistemas podemos citar el balance que existe en el organismo entre el proceso de activación y el de detoxificación. Cada órgano presenta una especificidad

particular para acumular la droga bajo la forma activa. Por otra parte, la especificidad de los distintos órganos para la reparación del DNA celular y la frecuencia de replicación del DNA en los órganos blanco para la droga, sumado a los procesos inmunológicos que afectan la respuesta del organismo, hacen que la evolución sea imposible de reproducir "in vitro".

Sin embargo, las ventajas que los ensayos a corto plazo ofrecen en tiempo y costo sobre los estudios realizados en animales, hacen de estos métodos una importante herramienta para la preselección de las sustancias probablemente carcinogénicas (Bartsch, H., 1976).

DETOXIFICACION DE LAS DROGAS

Si bien existen muchas sustancias que actúan en forma directa, otras requieren la transformación metabólica de promutágenos en mutágenos. Tal es el caso de los HAP, la aflatoxina B₁, las dimetilnitrosaminas y varias aminas aromáticas (McCann, J. y colaboradores, 1975b). Frecuentemente, este proceso es realizado por enzimas microsómicas del hígado que dependen del NADPH (Ames, B.N. y colaboradores, 1973b).

Por lo general, los sistemas de detoxificación en las células o en los sistemas eucariotes, que se emplean en los ensayos para la detección del poder mutagénico, son incapaces de realizar esta transformación. Es así que cuando muchas de estas drogas se ensayan en forma directa, dan resultados negativos.

Para solucionar esta falencia se ha incluido en los ensayos la detoxificación "in vitro". Esta actividad es realizada generalmente por el extracto microsómico de hígado de rata.

1. EXTRACTO MICROSOMICO DE HIGADO DE RATA

El sistema de detoxificación más ampliamente empleado en los ensayos a "corto plazo" es la fracción postmitocondrial del homogenado de hígado de rata (S-9), suplementado con un sistema generador de NADPH y cofactores (S-9 Mix).

En el método de Ames el S-9 se incorpora juntamente con la droga y las bacterias en el agar blando (Ames, B.N. y colaboradores, 1975).

También se ha empleado con éxito este tipo de activación en los ensayos con cultivos de Hamster chino (Kuroki, T. y colaboradores, 1977) y en otros ensayos que emplean bacterias, como el test de reparación (Slater, E.E. y colaboradores, 1971).

Al igual que el obtenido del hígado de las ratas, los

extractos provenientes de otras especies también se han mostrado efectivos . Por ejemplo, el S-9 de humanos aparece como el extracto más apto en la transformación de aflatoxina B₁ en aflatoxicol (Salhab, A.S. y Edwards, G.S., 1977).

Otros tejidos, como el páncreas, han demostrado eficacia en la producción de enzimas detoxificantes de drogas, tales como el benzopireno (Iqbal, Z.M. y colaboradores, 1977).

Kurelec, B. y colaboradores (1979) basándose en la inducción de benzopireno monooxigenasa en los peces, proponen el empleo de este tipo de detoxificación para estudiar la contaminación de las aguas con el método de Ames.

La gran variedad de respuestas obtenidas según el tipo de pretratamientos realizados a los animales, especies empleadas y sexo, ponen en tela de juicio, según Ashby, J. y Styles, J.A. (1978), la validez de la cuantificación realizada con estos sistemas.

Modificación de los niveles enzimáticos por las sustancias induc- toras

Es conocido que existen sustancias capaces de elevar el nivel de las enzimas hepáticas involucradas en el metabolismo de algunas drogas (Alvarez, A.P. y colaboradores, 1973; Ashby, J. y Styles, J.A., 1978).

Estos inductores se pueden clasificar en dos grupos:

Grupo I: Formado por sustancias del grupo de los barbituratos. Estos inductores son capaces de elevar los títulos de enzimas tales como la benzopireno hidroxilasa y etilmorfina-N-demetilasa, en el hígado y otros órganos de animales tratados.

De igual forma los niveles de citocromo P₄₅₀ se encuentran aumentados en los extractos microsómicos así obtenidos. Esta sustancia

actúa como aceptor de electrones en el sistema de oxidasas de función mixta a través del cual se metabolizan gran cantidad de drogas.

Grupo II: En este grupo se incluyen el benzopireno y el 3-metilcolantreno.

La especificidad del extracto inducido de esta forma es mucho más limitada que la del obtenido con el primer grupo de inductores, ya que sólo posee niveles incrementados de benzopireno hidroxilasa y del citocromo P₄₅₀. De esta manera la mayor efectividad que se obtiene con este S-9 parece limitarse a la detoxificación de los HAP.

Actualmente se emplea también como inductor el Aroclor 1254 (Alvarez, A.P. y colaboradores, 1973; Ames, B.N. y colaboradores, 1975) para la detoxificación "in vitro". Con esta mezcla de hidrocarburos policlorinados se obtiene una respuesta más general y el rango de actividad abarca sustratos comprendidos en los extractos inducidos por los grupos I y II.

Este tipo de activación (S-9_A) resulta especialmente indicado para la detoxificación de los HAP y coincidentemente es para estas drogas que se obtienen la mayor correlación con las pruebas de carcinogénesis (95%) "in vivo" (de Serres, F.J., 1976).

En otros casos, como el de la safrola, compuesto que pertenece al grupo de los hidrocarburos aromáticos, la activación con S-9_A no resulta efectiva, mientras que cuando se emplea extracto preparado con inductores del grupo II los resultados son positivos (White, T.J. y colaboradores, 1977). En otros casos se ha demostrado que la activación por S-9 obtenido de animales sin tratar resulta más efectivo que el S-9_A (Ashby, J. y Styles, J.A., 1978).

Sistemas enzimáticos antagónicos: su influencia en la respuesta obtenida

El pool enzimático empleado lleva en algunos casos, enzimas antagónicas entre sí. Este fenómeno es bien conocido por ejemplo para los HAP. Como ya lo anticipamos, la forma activa de estas drogas es generalmente un epóxido, cuyo grupo característico presenta propiedades nucleofílicas. La presencia de este grupo otorgaría a la molécula afinidad por el DNA (Barscht, H., 1976). No obstante, y a pesar de que la formación de este intermediario activo se encuentra catalizado por las enzimas microsómicas (oxidativas de función mixta), también están presentes en el extracto las epóxido hidratatasas, que actuarían en forma antagónica, es decir, catalizando la transformación del epóxido en un diol vecinal. De esta forma se inactivaría la actividad mutagénica de estas drogas.

Frente a este inconveniente algunos autores proponen la incorporación en el S-9 Mix de sustancias inhibidoras de este último sistema enzimático, con lo cual mejora notablemente la respuesta obtenida con algunos HAP (Ashby, J. y Styles, J. A.; 1978; Glatt, H.R. y colaboradores, 1979b).

Por ejemplo, el ensayo de mutagénesis de Ames para el estireno es positivo para la cepa TA100, cuando se emplea en la detoxificación S-9 preparado a partir de animales inducidos con 3-metilcolantreno. Pero esta respuesta parece depender de la incorporación al S-9 Mix de un potente inhibidor de la enzima epóxido hidratasa (3, 3, 3-tricloro-propen-1, 2-óxido) (la activación con S-9_A no da resultados positivos). Se ha comprobado, que la forma activa de este monómero es un feniloxirano, pero que este compuesto se inactiva metabólicamente ya sea por transformación en "diol" o bien por conjugación de la molécula con glutatión, realizada por la enzima S-glutatión transferasa. Este último proceso actuaría

disminuyendo la concentración intracelular de droga, ya que afectaría el pasaje del mutágeno a través de la membrana (Yoshikawa, K. y colaboradores, 1980). En la fracción soluble del preparado postmitocondrial, la enzima responsable de la inactivación del es tireno como mutágeno, parece ser la epóxido hidratasa, ya que la respuesta obtenida es independiente de la presencia de glutatión en el medio (El-Tantawy, M.A. y Hammock, B.D., 1980).

Existen muchos ejemplos para los cuales el S-9 es capaz de disminuir la respuesta y en algunos de ellos su determinación es importante para mejorar la correlación que existe entre los resul tados obtenidos "in vitro" con las pruebas en animales (Pourchase, I.F.H. y colaboradores, 1976).

En todos los casos, la predominancia de los sistemas activantes/desactivantes muestra una gran dependencia con el pretratamiento de los animales a partir de los cuales se obtuvo el extracto (Czygan, P. y colaboradores, 1973).

Limitaciones del extracto para reproducir el metabolismo "in vivo"

El poder mutagénico de un compuesto depende de las rutas posibles de activación y desactivación, así como de la potencia y estabilidad de los compuestos y sus posibles metabolitos, en el sistema empleado.

El hecho de que en los ensayos "in vitro" se empleen generalmen te fracciones subcelulares se traduce en la reproducción incomple ta del proceso que seguiría la droga "in vivo". Como propuesta, Beije, B. y colaboradores (1979) sugieren emplear el sistema de perfusión en el órgano aislado, para detoxificar las drogas. Con esto, por encontrarse la estructura celular intacta, el sistema sería capaz de reproducir todas las reacciones intracelulares imp licadas en el metabolismo de las drogas.

Sin embargo, aunque la mayoría de los procesos metabólicos de detoxificación se llevan a cabo preferentemente en el hígado, éste no sería el único órgano comprometido en el proceso de transformación de un pro-mutágeno en mutágeno, en un organismo superior.

Tamura, G. y colaboradores (1980), consideran que una etapa importante en el metabolismo, que no estaría representada en el S-9 Mix, sería la etapa intestinal que cataliza la hidrólisis de los glicósidos. Estos complejos, afectarían la concentración intracelular de las drogas. Para subsanar esta falencia los autores proponen el uso de un lisado de bacterias de la flora intestinal junto con el S-9 Mix. En estos lisados se encontraría presente la fecalasa, con potente actividad de glicosidasa.

Debido entonces a las limitaciones citadas, antes de catalogar una sustancia como mutagénica para animales superiores, se deben confirmar en ensayos "in vivo" los resultados obtenidos con sistemas rápidos (Bartsch, H., 1976).

2. OTRAS VIAS DE DETOXIFICACION

Una técnica de activación metabólica, también muy difundida, es el ensayo mediado por el huésped. Este método consiste básicamente en la introducción de las células "blanco" del ensayo de mutagénesis, en animales de laboratorio. Estas células son recogidas después de tratar al huésped con la droga en estudio. De esta forma se realiza la activación "in vivo" del mutágeno.

Como indicadores se han empleado con éxito varias cepas bacterianas: *Salmonella typhimurium* LT2/His G46, *Bacillus subtilis* rec A⁺/rec A⁻, *E. coli*, etc. (Mohn, G.R., 1977). Se han descrito de igual forma, ensayos de este tipo que emplean hongos tales como algunos mutantes de *Saccharomyces cerevisiae* (Fahring, R., 1975).

En los casos en que se emplean células eucariotes, las

condiciones son algo diferentes, ya que se debe reprimir la respuesta inmunológica en el huésped, ya sea por irradiación con luz U.V. o realizando estudios de compatibilidad (Fischer, G.A. y colaboradores, 1974). Commoner, B. y colaboradores (1974) y Durston, W. E. y Ames, B.N. (1974) proponen realizar la extracción con solventes de los posibles metabolitos de las drogas, en la orina de los animales tratados. Sobre los extractos así obtenidos, se realizan las determinaciones de poder mutagénico.

Con un fundamento semejante, Ficsor, G. y colaboradores (1977) emplean en los ensayos de mutagénesis la sangre y el plasma de los animales sometidos a la acción de la droga en estudio. De esta forma se busca encontrar en los fluídos los productos de la detoxificación realizada por los animales "in vivo".

Ultimamente, teniendo presente que los productos metabólicos de muchas drogas se eliminan por orina, se propone realizar estudios de mutagénesis en las poblaciones de individuos expuestos a sustancias consideradas riesgosas.

Para el test de Ames, la elevada concentración de histidina en la orina de humanos exige que se realice un pasaje por resinas de intercambio. Empleando este método, Ames, B.N. y McCann, J. (1977) lograron detectar poder mutagénico en la orina de los fumadores.

LAS BACTERIAS COMO INDICADORAS DEL IMPACTO MUTAGENICO

1. MECANISMOS DE REPARACION DEL DAÑO GENETICO Y SU RELACION CON EL TEST DE AMES

Si bien el proceso de reparación del DNA en las bacterias es necesario para preservar sus características genéticas, es al reconstruir la cadena alterada, cuando aparecen las mutaciones con mayor probabilidad.

En *Salmonella typhimurium* y *Escherichia coli* se pueden distinguir 4 tipos fundamentales de procesos de reparación:

- a) Fotorreactivación: Es un proceso específico de reparación del daño ocasionado por la luz U.V., por medio del cual se hidrolizan enzimáticamente los dímeros de timina. Este sistema, por sus características, estaría fuera del tema que estamos tratando.
- b) Reparación por escisión: Este proceso puede remover casi todos los tipos posibles de lesiones potencialmente mutagénicas. Por esta vía, se repara el sector del DNA dañado de acuerdo a las secuencias de bases complementarias presentes en la cadena hermana, que actúa como molde.

Este es un mecanismo altamente seguro y sólo con muy baja probabilidad origina mutaciones.

- c) Reparación por recombinación: Cuando en la cadena de DNA aparecen lesiones no reparadas éstas actúan como interrupciones en el molde para la enzima DNA polimerasa. En estos puntos se frena la replicación, para continuar más adelante, probablemente en el subsiguiente sitio de fijación del RNA "cebador".

De esta forma se generan interrupciones en la cadena en formación. Estos huecos se llenarían por apareamiento y recombinación con las zonas homólogas de la cadena de DNA hermana. Se

promovería así el proceso de reparación por recombinación.

Actualmente existen evidencias de que este mecanismo, que depende del producto del gen *recA*, es altamente seguro y por lo tanto no estaría directamente involucrado en la aparición de mutaciones inducidas (Green, M.H.L., 1978).

- d) Mecanismo S.O.S.: Este mecanismo alternativo es capaz de elongar la cadena de DNA sin molde, de manera que por esta vía se accede a una reparación del daño genético con una alta probabilidad de error.

Es éste un sistema generador de mutaciones, y probablemente sea la última alternativa para preservar la viabilidad de la célula, cuando todos los otros sistemas son incapaces de actuar.

Existen evidencias de que el mecanismo S.O.S. es inducible y que depende a su vez del producto del gen *recA* (Sedwick, S.G., 1975; Witkin, E.M., 1976). Probablemente se dispare éste cuando las lesiones en el DNA se encuentran enfrentadas en las dos cadenas. De esta forma, al no existir un molde para reconstruir la secuencia complementaria, la reparación se lleva a cabo por una polimerización al azar. La aparición de este tipo de respuesta estaría condicionada a la presencia de lesiones no reparadas en el DNA (Caillet Fouquet, P. y colaboradores, 1978).

MECANISMOS DE MUTACION EN BACTERIAS Y SU RELACION CON EL TEST DE AMES

Existen drogas que pueden alterar la estructura química de algunas bases del DNA modificando de esta forma la especificidad de apareamiento de las mismas. Se origina así durante la duplicación la inserción errónea de una base sobre la cadena en formación.

Por este mecanismo se producirían las mutaciones por agentes

alquilantes tales como N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG), metil-metano-sulfonato (MMS) y etil-etano-sulfonato (EES).

Al exponerse el DNA a la acción de la MNNG, por ejemplo, el producto más estable formado es la O⁶-metil-guanina. Esta alteración conduce en el 99% de los casos a transiciones del tipo -GC/-AT- (Coloundre, C. y Miller, J.H., 1977).

Por otra parte, una sustancia química puede interferir con las enzimas implicadas en la replicación del DNA, alterando la fidelidad en la copia. Por este mecanismo es que se explica la mutagénesis inducida por metales tales como el Mn⁺². La presencia de este ión en el medio aumenta el error de replicación "in vitro" de la DNA polimerasa (Sirover, M.A. y Loeb, L.A., 1976).

Otro posible mecanismo para provocar este tipo de mutaciones es la modificación del DNA de forma tal que no pueda funcionar como molde para la replicación. Se perdería entonces la viabilidad de la cepa. Sin embargo, como hemos visto, existe un mecanismo alternativo para la reparación del daño que no requiere molde. Este mecanismo de emergencia ocurre con una alta probabilidad de error y sería el responsable de las mutaciones inducidas por agentes como la radiación U.V., radiaciones ionizantes y la Mitomicina C (Witkin, E.M., 1976).

Dado que el área correspondiente a un par de bases es de 50 Å² los sistemas aromáticos tendrían la medida justa para intercalarse entre dos pares de bases, favoreciendo así la estabilización de los apareamientos desplazados. De esta forma se originarían las mutaciones por corrimiento del marco de lectura, por la acción de los agentes intercalantes sobre el material genético (Ames, B.N. y colaboradores, 1972).

En estos casos es importante para la interacción droga-DNA, el entorno molecular del locus sobre el cual actúa y esto podría condicionar la respuesta mutagénica.

Por ejemplo, la 9-aminoacridina revierte el corrimiento + 1

del locus His C presente en la cepa TA1537, lo que ocurre probablemente por delección de una guanina en el entorno -GGGG- característico de esta región del DNA. Pero, este mutágeno no se muestra efectivo en la reversión de la mutación característica de la cepa TA1538. Esta es también una mutación de corrimiento, pero se encuentra en un entorno molecular diferente (-GCGCGC-) (Ames, B.N. y colaboradores, 1973a).

Estas observaciones correlacionan muy bien con los resultados presentados recientemente por Young, P.R. y Kallenbach, R.N. (1981), quienes lograron demostrar una interacción diferente de la molécula con la doble cadena, según la secuencia en la que se intercale. Para el caso de las 9-aminoacridinas, cuando el entorno es -CCCC- la molécula se intercalaría en la cadena que contiene la secuencia -GGGG-. Así se podría proponer la formación de puentes de hidrógeno entre la droga intercalada y la citocina de la cadena hermana. Este mecanismo podría originar la delección de una guanina, hecho que revertiría la mutación +1 de la cepa TA1537 (Young, P.R. y colaboradores, 1981).

La secuencia de bases en la región mutada de la cepa TA1538 favorecería la intercalación de este agente preferentemente entre las dos cadenas hermanas más que sobre una de ellas y de esta forma no sería posible la formación de puentes de hidrógeno entre la droga y las bases del DNA. En concordancia con estas observaciones, la 9-aminoacridina, no revierte a esta cepa (Ames, B.N. y colaboradores, 1973a). Dentro de este tipo de mutágenos, como hemos visto, los más potentes son los que se unen covalentemente al DNA. Como ejemplo podemos citar al benzopireno-diol-epóxido (Tsuyoshi, K. y Yamamoto, H.A., 1978). Se ha demostrado que esta droga se une formando enlaces con el DNA. De esta forma aparece una notable disminución en el giro de superhélice (estado de relajación parcial). En preparados de DNA tratados con esta droga aparecen

al microscopio electrónico, anillos abiertos, líneas e incluso zonas de desnaturalización parcial.

Cuando los mutágenos se unen de esta forma al DNA, el daño originado puede repararse por el sistema de reparación por escisión, con lo cual se separan las lesiones potencialmente mutagénicas. Cuando las bacterias son deficientes en este sistema, tal como ocurre con las mutantes Δ uvrB, la reparación ocurre por otras vías alternativas para las que, como hemos visto, la probabilidad de mutación es mucho mayor.

Es de esperar que cuando la droga lesiona el material genético, la respuesta mutagénica sea más sensible para las cepas deficientes en el producto del gen uvrB. Es así que para el caso de la 9-aminoacridina, para la cual se propone una intercalación simple, Young, P.R. y colaboradores (1981) no han encontrado diferencias en la respuesta de la cepa TA1537 (Δ uvrB) con la de la cepa TA1977, que lleva intacto el sistema de reparación por escisión. Por otra parte, para el caso de los derivados nitrados del fluoreno, la respuesta es menor cuando se emplea para la determinación del comportamiento a la cepa con el sistema de reparación completo (McCoy, E. y colaboradores, 1981).

Por el momento no se conoce de qué forma se produce la mutación por corrimiento: es decir, si es que aparece durante la replicación normal o durante el proceso de reparación. Probablemente el mecanismo difiera según el agente que causa la alteración (Mohn, G. R. 1977).

3. EXPRESION FENOTIPICA DE LAS MUTACIONES

En todos los test de mutación es necesario un período de crecimiento, post-tratamiento, para que la alteración ocasionada al DNA se manifieste fenotípicamente.

En el ensayo de Ames la expresión de las mutaciones se

permite adicionando al agar selectivo trazas de histidina (Ames, B.N. y colaboradores, 1973a).

Según lo reportan Malaveille, C.B. y colaboradores (1977) para la cepa TA100, las bacterias entran en fase logarítmica a las tres horas aproximadamente de haberse sembrado en la caja, y permanecen en ese estado de crecimiento por espacio de cuatro horas. A medida que se agota el aminoácido, la velocidad de crecimiento de la población disminuye hasta detenerse por completo. El número final al que se arriba (en las condiciones clásicas) es de 3 a 8×10^9 bacterias por caja, es decir que el número inicial se incrementa de tres a cuatro veces. Esta población es la que forma la pátina de microcolonias sobre la cual se destacan las colonias His⁺ mutantes.

Dado que el valor de la frecuencia de reversión espontánea en la caja es suficientemente significativo, durante las generaciones que en ella transcurren aparecen nuevas mutantes His⁺, diferentes de las que se incorporaron junto con el inóculo.

Con esto queda claro que, según la hipótesis de reversión espontánea de Luria, S.E. y Delbrück, M. (1943), en las cajas correspondientes a los controles en el test de Ames, el número de revertantes depende del número final de individuos de la población y este valor está condicionado a la cantidad de aminoácido presente (ver discusión).

EL TEST DE AMES: CARACTERÍSTICAS DE LAS CEPAS BACTERIANAS EMPLEADAS

Las cinco cepas empleadas en el método clásico de Ames son derivadas de la cepa de *Salmonella typhimurium* LT₂ y llevan mutaciones puntuales características en el operón Histidina, que se manifiesta en un requerimiento de dicho aminoácido (Ames, B.N. y colaboradores, 1973a). El genotipo de cada una de ellas se describe en la Tabla 1.

CEPA TA1537

Esta cepa lleva la mutación por corrimiento del marco de lectura hisC3076.

Por experiencias de transducción con el fago P22 se ha demostrado que esta mutación es suprimida por el supresor supB (Ames, B.N. y colaboradores, 1973a). Este supresor corresponde al tRNA que transporta al aminoácido prolina. Probablemente la mutación supresora ocurra por la adición de una guanina en el anticodon de este tRNA con lo cual se transformaría de (-G-G-G-) en (-G-G-G-G-). De esta manera, puede insertar en la cadena polipeptídica en formación una prolina cuando en el código del DNA aparece erróneamente la secuencia (-C-C-C-C-) (Hartman, P.E. y colaboradores, 1971b).

Teniendo en cuenta las características de la mutación supresora, se propone que la mutación en esta cepa se deba a la inserción del par $\begin{smallmatrix} -C- \\ -G- \end{smallmatrix}$ en el triplete que codifica para el aminoácido en cuestión, dando origen a un corrimiento + 1 del marco de lectura.

Esta cepa es revertida por agentes intercalantes, tales como la 9-aminoacridina.

CEPA TA1538

La mutación característica de esta cepa se encuentra localizada en el gen hisD que codifica para la enzima histidinol deshidrogenasa (hisD3052). Por análisis peptídico de la histidinol deshidrogenasa

Tabla 1
Genotipo de las cepas usadas en el test de Ames

| Cepa | Mutaciones en el locus His | Mutaciones adicionales | | |
|--------|----------------------------|------------------------|----------|-----------------|
| | | Sistema de reparación* | Factor R | Pared celular** |
| TA1535 | His G46 | Δ uvrB | - | rfa |
| TA1537 | His C3076 | Δ uvrB | - | rfa |
| TA1538 | His D3052 | Δ uvrB | - | rfa |
| TA98 | His D3052 | Δ uvrB | + | rfa |
| TA100 | His G46 | Δ uvrB | + | rfa |

* La delección en el locus Δ uvrB afecta el sistema de reparación por escisión.

** La mutación rfa afecta el enlace lateral lipo-polisacárido de la pared celular de las bacterias otorgándoles así el carácter altamente rugoso.

deficiente se ha propuesto que esta mutación se debe a una delección -2 de los pares $\begin{smallmatrix} -G-C- \\ -C-G- \end{smallmatrix}$ en la zona de secuencia probable -G-C-G-C-. La reversión a fenotipo salvaje ocurriría por otra delección, lo que se corresponde con la observación de que esta cepa es revertida por los agentes intercalantes (Hartman, P.E. y colaboradores, 1971a).

CEPA TA1535

La mutación característica de esta cepa se encuentra en el gen His G (His G46) que codifica para la enzima fosforilasa, que forma parte de las siete enzimas codificadas por el operón Histidina.

La mutación característica es una mutación sin sentido, probablemente del tipo ocre y es revertida por una gran variedad de mutágenos carcinogénicos que causan substitución de pares de bases, pero no por aquéllos que originan un corrimiento del marco de lectura. Sin embargo, aún no está claro qué intercambio de bases es el que revierte esta cepa (Ames, B.N. y colaboradores, 1973a).

CEPA TA100

Fue construída por transferencia del plásmido R-PKM 101 a la cepa TA1535, a partir de una cepa donante auxótrofa.

La selección se realizó por el requerimiento de histidina y por la resistencia a la ampicilina. Este último marcador se encuentra en el plásmido transferido (Ames, B.N. y colaboradores, 1975).

Las características de reversión de esta cepa son semejantes a las de la bacteria de la cual deriva, pero en muchos casos la respuesta se incrementa notablemente por la presencia del plásmido.

CEPA TA98

Con las mismas características que en el caso anterior, se

construyó a partir de la cepa TA1538 a la cepa TA98 (Ames, B.N. y colaboradores, 1975).

1. MUTACIONES ADICIONALES QUE INCREMENTAN LA RESPUESTA DE LAS CEPAS

Como se detalla en la Tabla 1, las cinco cepas usadas llevan, además de las mutaciones his^- , otras dos adicionales en otros loci del genoma, que sensibilizan la respuesta a los mutágenos:

$\Delta uvrB$: Es una delección en la zona del gen $uvrB$. El producto de este gen, junto con las proteínas $uvrA$ y $uvrC$, interviene en etapas tempranas del mecanismo de reparación por escisión, con actividad de endonucleasas (Seeberg, E. y colaboradores, 1976).

De esta forma, la delección que llevan estas cinco cepas ($\Delta gal-uvrB$ -Biot) incrementa notablemente la respuesta de las bacterias a aquellas sustancias que sean capaces de lesionar su material genético.

Carácter altamente rugoso: La mutación rfa elimina la cadena polisacárida lateral de la cubierta lipopolisacárida que forma la pared celular de la bacteria. De esta forma se aumenta la permeabilidad y se pierde por completo la patogenicidad de las células (Ames, B.N. y colaboradores, 1973a).

2. EL PLASMIDO PKM101 Y SU IMPORTANCIA EN EL INCREMENTO DE LA RESPUESTA MUTAGENICA DE LAS CEPAS

Para incrementar la sensibilidad de la respuesta de las cepas, Ames, B.N. y colaboradores (1975) incorporaron a dos de ellas un factor R, denominado PKM101, que otorga resistencia a determinados antibióticos.

La inclusión del plásmido se basó en las observaciones de McPhee, D.G. (1973) quien encontró que las mutaciones inducidas por

el MMS en la cepa *Salmonella typhimurium* LT₂/His G46 aumentaba notablemente cuando la cepa mutante llevaba el factor R-Utrecht. En este caso el plásmido empleado es el PKM101, marcado con resistencia a la Ampicilina. La presencia de este plásmido en *Escherichia coli* protege a la bacteria del daño ocasionado por la radiación U.V., aumentando los porcentajes de sobrevivencia, pero este fenómeno está condicionado a la funcionalidad de los genes *recA*, *LexA* y *uvrE*. No se ha aclarado aún la relación que hay entre estos genes. Probablemente existan pasos en común en las funciones que estos codifican, o el producto de estos genes regule la expresión del fenotipo mutable (Walker, G.C., 1979).

La reparación del daño incrementada por la presencia del plásmido no restituye necesariamente la secuencia original y aumenta notablemente la aparición de errores, que son los responsables de las mutaciones observadas (Goze, A. y Devoret, R., 1979).

En *E. coli* se ha demostrado la presencia de un locus genético denominado *umuC*, diferente del *lexA* y *recA*, que codificaría para la bacteria una función semejante a la que aporta el plásmido (reparación/mutabilidad). La presencia del factor R suprime cualquier mutación en este gen (Walker, G.C., 1979).

Langer, P.J. y colaboradores (1981) han determinado que existe una porción en el genoma del plásmido que codifica para el fenotipo de resistencia a la radiación U.V., incrementando la posibilidad de mutación. Este mecanismo no sería idéntico al que corresponde al mecanismo S.O.S., que incluye además el crecimiento filamentoso de las bacterias y la inducción del fago en bacterias lisogénicas. Según lo proponen Goze, A. y Devoret, R. (1979) el plásmido PKM101 codificaría para un mecanismo de reparación constitutivo diferente del S.O.S. inducible descrito en *E. coli*. Se ha comprobado, usando diferentes mutantes de *E. coli* que el aumento

de la mutabilidad provisto por la presencia del factor R, actuaría sólo sobre algunos genes y su acción estaría condicionada al mecanismo de acción de la droga (Mohn, G.R. y colaboradores, 1980).

Efecto de PKM101 sobre la respuesta de la cepa TA1535

Algunas drogas tales como el EMS revierten con igual efectividad tanto a la cepa TA1535 como a la TA100 (TA1535 + PKM101). Para otros casos tales como la aflatoxina B₁, benzopireno, furfurilamida, la respuesta es mucho más sensible para la cepa que lleva el factor R (McCann, J. y colaboradores, 1975a).

A pesar de que la mutación característica de la cepa TA100 se origina por un intercambio de pares de bases, algunos mutágenos que causan corrimiento del marco de lectura son capaces de revertirla. La condición para que esto ocurra parece ser la formación de enlaces covalentes droga-DNA. En muchos casos la respuesta obtenida es más sensible que la correspondiente a las cepas TA1537 y TA1538, que son mutantes de corrimiento. Este fenómeno probablemente se deba a la reparación del daño originado al material genético, por el sistema codificado en el factor R. En el transcurso de esta reparación ocurriría una sustitución de pares de bases que suprimiría la mutación sin sentido de la cepa.

El efecto mutagénico de la Mitomicina C no se manifiesta en la cepa TA100, que es deficiente en el sistema de reparación por escisión, pero da respuesta positiva con la cepa HisG46/PKM101, que tiene fenotipo salvaje para este carácter (Mohn, G.R. y colaboradores, 1980).

Probablemente la acción de endonucleasa en la zona donde se producen los entrecruzamientos de cadena, originados por la acción de esta droga, sea fundamental para obtener la respuesta

mutagénica.

La cepa TA100 es más resistente a la acción letal de la luz ultravioleta o de la aflatoxina B₁ (Wheeler, L. y colaboradores, 1981), tal como era de esperar de acuerdo a las características fenotípicas que el plásmido otorga a las bacterias.

Efecto del plásmido PKM101 sobre la cepa TA1538

Por incorporación del plásmido a la cepa TA1538 se obtiene la cepa TA98. Nuevamente en este caso la presencia del factor, sensibiliza notablemente la respuesta para el caso de los agentes intercalantes activos, tales como la aflatoxina B₁ y el 7, 12-dimetilbenzantraceno. Sin embargo, en casos como las drogas ICR-191 o el 2-nitrosofluoreno, que son agentes intercalantes simples, la respuesta es idéntica para ambas cepas (McCann, J. y colaboradores, 1975a).

M A T E R I A L E S

Y

M E T O D O S

MATERIALES

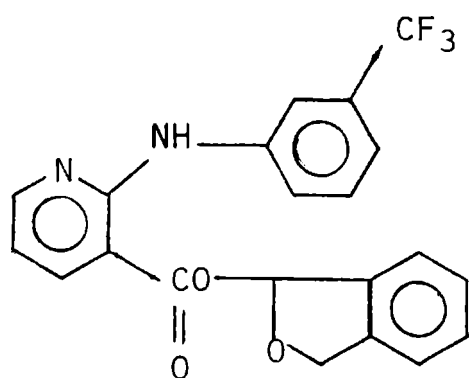
1. DROGAS ENSAYADAS

Para poner a punto el método y verificar las características de reversión de las cepas se usaron los siguientes mutágenos patrones:

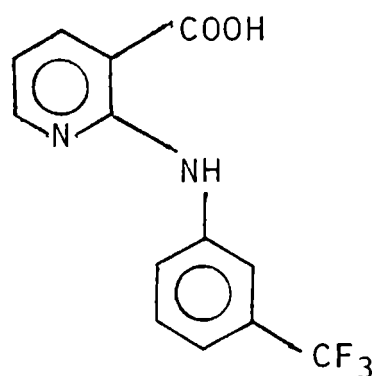
MNNG (Fluka), bromuro de etidio (Sigma), 9,10-dimetilbenzantraceno (Sigma), bencidina (Merck), aflatoxina B₁ y benzopireno (ambas drogas provistas por el Dr. Julio Celis).

Como solvente de las drogas insolubles en agua se utilizó dimetilsulfóxido (Fluka).

En la segunda etapa de nuestro trabajo ensayamos dos antiinflamatorios: ácido niflúmico (AN) y ftalida del ácido niflúmico (FAN), cuyas fórmulas desarrolladas son las siguientes:



ftalida del ácido niflúmico



ácido niflúmico

Estas drogas fueron provistas por Laboratorios Bagó.

Para la preparación del S-9 Mix se empleó nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADP) (Sigma), glucosa-6-fosfato (G6P) (Sigma) y L-Histidina.ClH (BDH).

Las sales empleadas en el medio mínimo y como cofactores en el S-9 Mix fueron de Fluka.

En todos los casos las drogas empleadas fueron pro-análisis.

2. MEDIOS DE CULTIVO

Caldo nutritivo (NB)

0.8 g de caldo nutritivo (Difco) y 0.5 g de ClNa en 100 ml finales.

Medio Vogel-Bonner "E" (50X)

0.8 g de $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 40.2 g de PO_4HK_2 ; 11.5 g de $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{NH}_4$ y 10.0 g de ácido cítrico en 100 ml finales. pH = 7.0.

Medio mínimo para cajas (MM)

1.5 g de agar Difco y 2.0 g de glucosa (Herbaria) en 100 ml finales de medio Vogel-Bonner "E" (1X).

Agar blando

0.6 g de agar Difco y 0.5 g de ClNa en 100 ml finales.

Los requerimientos de las cepas se incorporaron en el agar blando, obteniéndose así los distintos medios mínimos.

a) Medio selectivo de Ames (con trazas de histidina) (MMA):

5 μmoles de L-Histidina.ClH y 5 μmoles de D-Biotina en 100 ml finales.

b) Medio completo (para titulación) (MMHB):

500 μmoles de L-Histidina.ClH y 5 μmoles de D-Biotina en 100 ml finales.

c) Medio selectivo para bacterias His^+ (MMB):

5 μmoles de D-Biotina en 100 ml finales.

Diluyente

0.8 g de ClNa en 100 ml finales.

METODOS

1. EXTRACTO MICROSOMICO DE HIGADO DE RATA

Inducción de los animales

- a) Inducción con Aroclor : El Aroclor 1254 (Monsanto), diluido en aceite de maíz a una concentración de 200 mg por mililitro se suministró a los animales en una dosis de 500 mg por Kg de peso, en inyección intra peritoneal. Los animales se mantuvieron 5 días con dieta normal y 12 horas antes del sacrificio se les retiró el alimento. Transcurrido ese tiempo se decapitaron y se les extrajo el hígado. A partir de este órgano se preparó el S-9_A.
- b) Inducción con fenobarbital: Una semana antes del sacrificio se reemplazó el agua para beber por solución 0.1% de fenobarbital sódico. Siguiendo la misma metodología que se relata en el punto anterior se obtuvieron los órganos con los que se preparó el S-9_F.
- c) Inducción con ácido níflámico: La droga se administró por sonda gástrica en una dosis de 75 mg por Kg de peso durante tres días, procediéndose al sacrificio de los animales al quinto día, de la misma forma que para la inducción con Aroclor.
- d) Animales sin tratamiento: Los animales de este lote se mantuvieron en dieta normal. A partir de los órganos extraídos se preparó el S-9_{_}.

Los animales empleados en todos los casos fueron ratas machos Sprague-Dawley de 300 a 350 g de peso.

Preparación del homogenado

Todos los pasos para la preparación se realizaron a 0-4°C con instrumental y material estéril.

Los hígados extraídos se lavaron con solución previamente pesada de ClK 0.15 M. Se calculó el peso húmedo de hígado por diferencia y se transfirieron los órganos a vasos de precipitado con 3 ml de ClK 0.15 M por g de peso húmedo de hígado. Después de cortar los órganos con tijeras estériles, se homogeneizaron en Potter con émbolo de teflón.

Los homogenados se centrifugaron a 8.700 rpm durante 10 minutos en una centrífuga Sorvall RC2-B con rotor SS-34. El sobrenadante se fraccionó (2 ml), se enfrió rápidamente con hielo seco y se conservó a -80°C hasta el momento de usar.

En general 1 ml de la fracción S-9 contiene los microsomas de aproximadamente 250 mg de peso seco de hígado (Ames, B.N. y colaboradores, 1975).

Preparación del S-9 Mix

La mezcla enzimática contiene por mililitro:

| | | |
|--------------------|---------------|------------------------------|
| S-9 | 0.04 a 0.2 ml | |
| Cl ₂ Mg | 8 µmoles | } Cofactores |
| ClK | 33 µmoles | |
| G6P | 5 µmoles | } Sistema generador de NADPH |
| NADP | 4 µmoles | |

Solución buffer

PO₄H₂Na/PO₄HNa₂ 100 µmoles
pH : 7.4

2. CONTROL DE LOS FENOTIPOS DE LAS CEPAS

Prueba de sensibilidad al cristal violeta (Controla el carácter altamente rugoso de las cepas)

Se sembró por el método de la doble capa, en caldo nutritivo agarizado, 0.1 ml de un cultivo saturado de la cepa a probar. En la zona central se depositó un disco de papel de filtro con el colorante (10 µl de 1 mg/ml). Después de 12 horas de incubación, la aparición de una zona de inhibición, con un radio aproximado de 14 mm, indicó la permanencia del carácter rfa.

Sensibilidad a la radiación U.V.

Se realizó una estría de la cepa en estudio sobre agar nutritivo y se irradió la mitad de la estría con una lámpara germicida de 30 Watts durante 6 segundos (las cepas con el factor R se irradiaron 8 segundos), desde una altura de 60 cm.

Después de la incubación no apareció desarrollo en la zona irradiada, lo que indicó la permanencia de la mutación Δuvr .

Resistencia a la ampicilina (cepas TA98 y TA100)

Se realizó un trazo sobre una placa de agar nutritivo con una pequeña cantidad de antibiótico (10 µl de solución 8 mg/ml en 0.02 N de ClNa). Una vez seco se realizaron estrías perpendiculares al trazo.

En el caso de las cepas portadoras del factor R, después de la incubación, la estría no presentó interrupciones.

3. METODO DE AMES PARA LA DETERMINACION DE PODER MUTAGENICO

Revertantes por caja

A 2 ml de MMA fundido a 48°C se incorporaron respetando el orden:

0.1 ml de cultivo (crecido durante la noche en caldo nutritivo)

0.1 ml o menos de la solución de la droga a probar

0.5 ml de S-9 Mix (en los ensayos con detoxificación)

La mezcla así obtenida se agitó y se sembró rápidamente en placas con MM. Después de 48 horas de incubación a 37°C, se realizó el recuento de colonias His⁺ que aparecen sobre la pátina de microcolonias formada a expensas de las trazas de histidina presentes en el medio.

El aumento en el número de revertantes en presencia de droga, con respecto al control (reversión espontánea), indica comportamiento mutagénico. Se fija como límite inferior para considerar positiva la respuesta obtenida al doble de la reversión espontánea de cada cepa.

Unidades formadoras de colonia en presencia de droga

A dos mililitros de medio MMHB fundido a 48°C se agregó:

0.1 ml de una dilución de cultivo de tal forma de obtener un número contable de colonias,

0.1 ml o menos de la solución de droga a probar

0.5 ml de S-9 Mix (en los ensayos con detoxificación)

A partir de aquí se procedió como en el punto anterior.

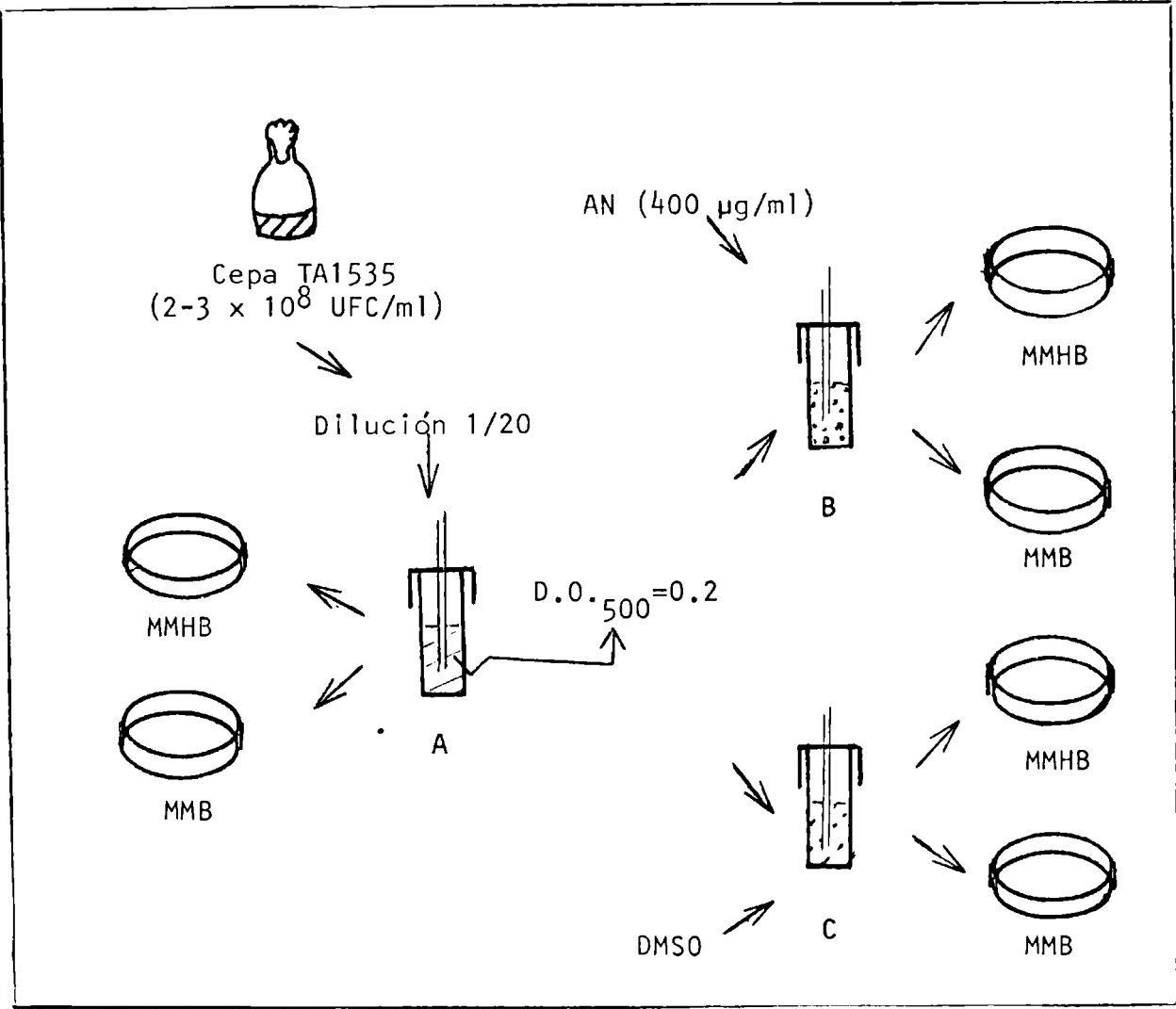
4. DETERMINACION DE PODER MUTAGENICO EN MEDIO LIQUIDO

Este método, que presentamos en el Esquema 1, se empleó en el estudio del ácido niflúmico sobre la cepa TA1535.

Un cultivo de la cepa TA1535 en fase logarítmica se diluyó 1/20 en medio MMHB (líquido). En el cultivo diluido se determinó el número de bacterias His⁺/ml (sembrando 0.1 a 0.5 ml de cultivo en MMB) y el número de unidades formadoras de colonias por ml (U.F.C./ml), sembrando una dilución apropiada en medio MMHB.

Esquema 1

Determinación de poder mutagénico en medio líquido



Las muestras de la cepa TA1535 se tomaron a distintos tiempos previo al agregado de droga (A), y después del agregado de ácido níflúmico (B) o dimetilsulfóxido (C), según se trate del tubo problema o del tubo control.

Cuando la DO_{500} del cultivo alcanzó aproximadamente las 0.2 unidades se fraccionó, obteniéndose así dos cultivos. A uno de ellos se le incorporó la droga a estudiar (en el caso de AN: 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y al otro el diluyente empleado para la droga.

A distintos tiempos se determinó el número de bacterias His^+ /ml y el número de U.F.C. por ml de la forma descripta.

5. ESTUDIO DE LA DETOXIFICACION DEL MEDIO POR LAS BACTERIAS

Para estudiar la posibilidad de la detoxificación del medio por las bacterias a partir del ensayo relatado en el punto anterior se realizó el siguiente experimento:

A partir del tubo B del experimento anterior (cultivo con AN) cuando la DO_{500} alcanzó aproximadamente las 0.4 unidades, se filtró obteniéndose de esta forma el medio FA.

De igual manera a partir del tubo control se obtuvo FC. A una alícuota de este medio se le incorporó AN (400 $\mu\text{g}/\text{ml}$) obteniéndose el medio FC + AN.

En estos tres medios se diluyó apropiadamente un cultivo en fase logarítmica de la cepa TA1535, de forma de obtener en el cultivo diluído una DO_{500} de 0.2 a 0.3 unidades. La evolución del inóculo en los tres cultivos se siguió por lectura de DO_{500} y por recuento de U.F.C. por mililitro, en medio MMHB.

PUESTA A PUNTO DEL MÉTODO

En este capítulo describiremos en forma resumida los ensayos de puesta a punto que realizamos en las primeras instancias de nuestro trabajo.

En esta etapa logramos no sólo comprobar que el sistema funcionaba de acuerdo a los datos originales, sino también comprender más en profundidad sus alcances y limitaciones.

De esta manera, la experiencia acumulada fue de gran importancia para el posterior desarrollo de nuestro plan de investigación.

1. TIPIFICACION DE LAS CEPAS

Para constatar el fenotipo característico de cada una de las cepas empleadas, realizamos controles periódicos de acuerdo al protocolo original (Ames, B.N. y colaboradores, 1975).

Control del carácter altamente rugoso

Para determinar la permanencia de la pérdida de la barrera de lipopolisacáridos en las cepas, se realizó la prueba de sensibilidad al colorante cristal violeta. El fenotipo altamente rugoso se manifiesta por la inhibición del crecimiento en presencia de la droga.

Control de sensibilidad a la radiación U.V.

Se detecta la delección Δuvr por la mayor inhibición del crecimiento que la radiación ultravioleta ejerce sobre las bacterias.

Control de la resistencia a la ampicilina

El factor R (PKM101) otorga a las cepas portadoras (TA98 y TA100) resistencia a la ampicilina. El desarrollo de estas cepas

R E S U L T A D O S

CAPITULO I

PUESTA A PUNTO DEL METODO

en presencia del antibiótico confirmó la presencia del plásmido.

2. PREPARACION DEL EXTRACTO MICROSOMICO Y DETERMINACION DEL NIVEL ENZIMATICO DEL MISMO

Conforme a lo estipulado por Ames, E.N. y colaboradores (1975) en su protocolo, se prepararon las fracciones postmitocondriales de hígado de rata (ver Materiales y Métodos).

Al extracto preparado a partir de animales tratados con Aroclor 1254 lo llamamos S-9_A y S-9_F cuando la sustancia inductora empleada fue fenobarbital.

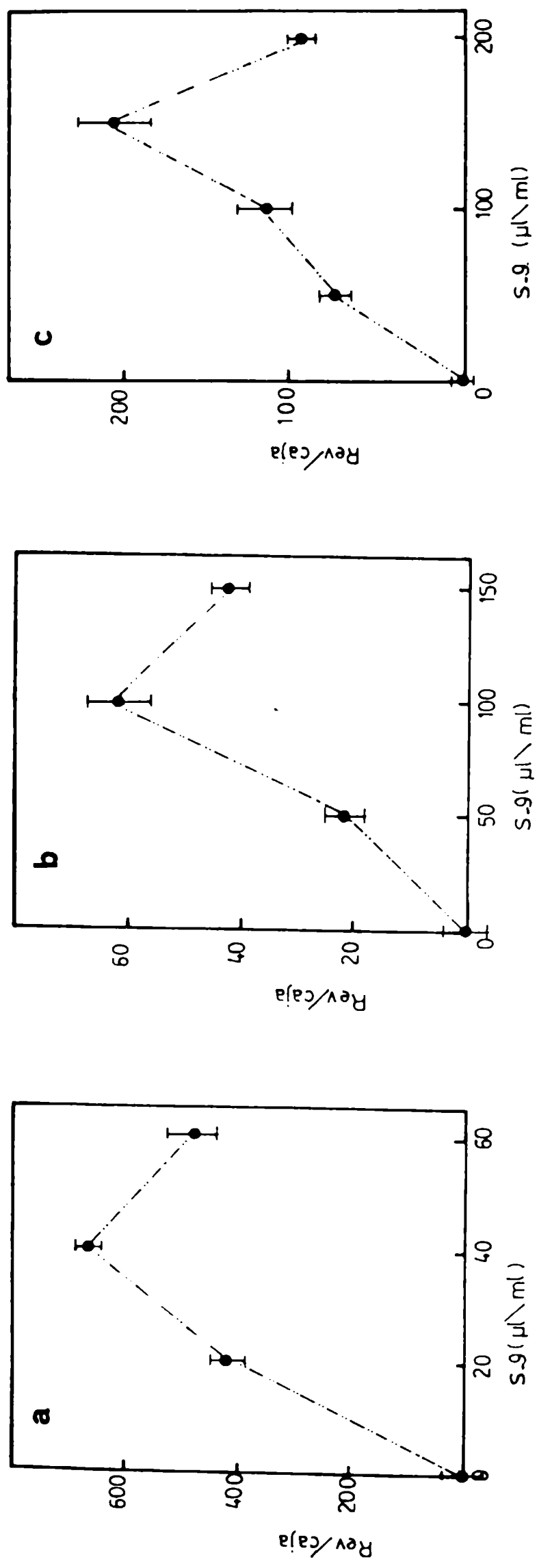
Para cada lote de extracto, se procedió a determinar la cantidad óptima del mismo a usar por mililitro de S-9 Mix. En la Figura 1a se reproducen los resultados obtenidos en una de estas experiencias, cuando se determinó el nivel necesario de S-9_A, para obtener la máxima respuesta de la cepa TA100 frente a 5 µg por caja de benzo(a)pireno. En la Figura 1b aparecen los resultados obtenidos con la cepa TA1538 y 5 µg de 9,10-dimetilbenzantraceno con diferentes concentraciones de S-9_A. Finalmente, en la Figura 1c los resultados corresponden a la cepa TA1538 y 150 µg por caja de bencidina cuando se empleó S-9_F en la detoxificación.

Para las dos primeras drogas las cantidades óptimas de S-9_A no coincidieron, obteniéndose reiteradamente el pico de actividad para el 9,10-dimetilbenzantraceno a mayores concentraciones de extracto. Esto demuestra que para un mismo tipo de activación la cantidad óptima de S-9 está determinada por la droga ensayada.

En la Figura 1c se observa la necesidad de 150 µl de extracto por mililitro de S-9 Mix para obtener la máxima respuesta. Este valor no resulta sorprendente ya que es sabido que el S-9_A es de dos a tres veces más efectivo que el S-9_F (Alvarez, A.P. y colaboradores, 1973). Por otra parte, los resultados coinciden con los

Figura 1

Determinación de la cantidad óptima del extracto S-9 por mililitro de S-9 Mix



Se realizaron determinaciones según el método de Ames, B.N. y colaboradores (1975), manteniendo fijas las concentraciones de los mutágenos y variando la de los extractos incorporados al S-9 Mix.

a. Cepa TA100 con 5 µg de benzopireno detoxificado con S-9_A.

b. Cepa TA1538 con 5 µg de 9,10-dimetilbenzantraceno detoxificado con S-9_A.

c. Cepa TA1538 frente a 150 µg de bencidina detoxificada con S-9_F.

A cada punto se le restó el valor correspondiente a la reversión espontánea, que fue de 120 revertantes para la cepa TA100 y 19 para la cepa TA1538.

Las barras indican 1 DS (n = 6).

obtenidos por otros autores (Ames, B.N. y colaboradores, 1973b).

Con la cepa TA1538 y el mutágeno bencidina se realizó una prueba adicional para determinar la dependencia que existía entre la concentración de NADP (cofactor enzimático del S-9 Mix) y la respuesta de la cepa para dosis constantes de extracto y de droga (Figura 2). Los resultados demostraron que la activación metabólica de esta droga depende estrictamente de la cantidad de NADP presente. En los ensayos siguientes se emplearon 4 μ moles de NADP por mililitro de S-9 Mix. Esta cantidad fue elegida teniendo en cuenta la respuesta obtenida y el alto costo de la droga.

3. REPRODUCCION DE LAS CURVAS DOSIS-RESPUESTA TOMADAS DE LA BIBLIOGRAFIA

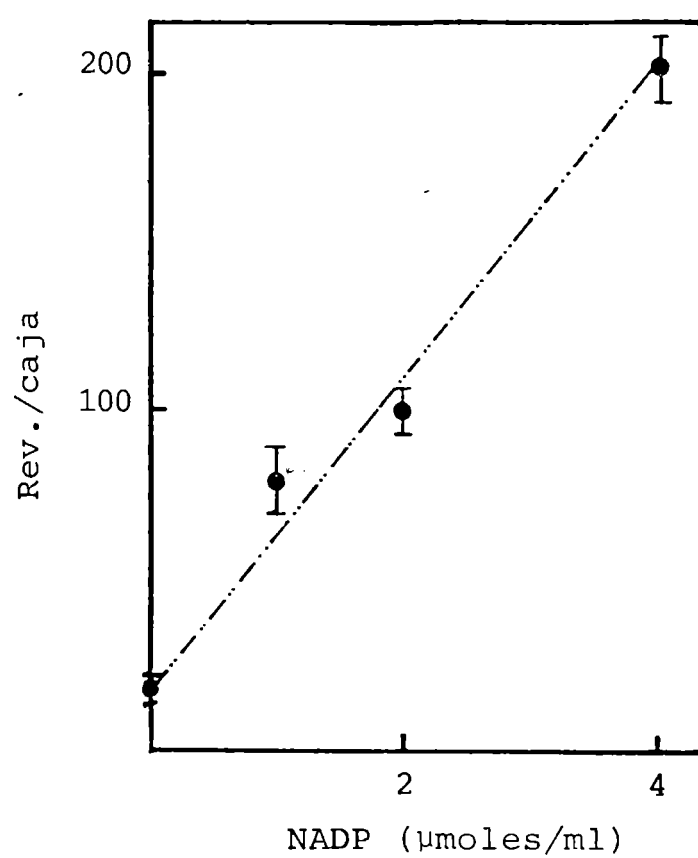
Para la puesta a punto del método se realizaron estudios dosis-respuesta con varias drogas ya probadas y cuyos resultados figuraban en la bibliografía, para asegurar que en nuestras manos el sistema repetía los resultados obtenidos por otros autores.

Cuando probamos con el mutágeno MNNG las cepas TA1535 y TA1538 obtuvimos las curvas dosis-respuesta de la Figura 3. Según estos resultados, la cepa TA1538 (Figura 3b) con una dosis de 10 μ g por caja sólo alcanzó el doble de la reversión espontánea y este valor estaría en el límite para considerarla como una respuesta mutagénica. Al aumentar la dosis el número de revertantes disminuye, probablemente por influencia del efecto tóxico.

Por el contrario la cepa TA1535 responde en forma muy sensible a la droga (Figura 3a) y con una dosis de 5 μ g por caja el número de revertantes aumenta 100 veces con respecto al control. En ambos casos los resultados fueron comparables con los de la bibliografía (Ames, B.N. y colaboradores, 1975; Ames, B.N. y colaboradores, 1973 a).

Figura 2

Variación de la respuesta de la cepa TA1538 frente a 150 μg de ben-
cidina, con la concentración de NADP en el S-9 Mix.

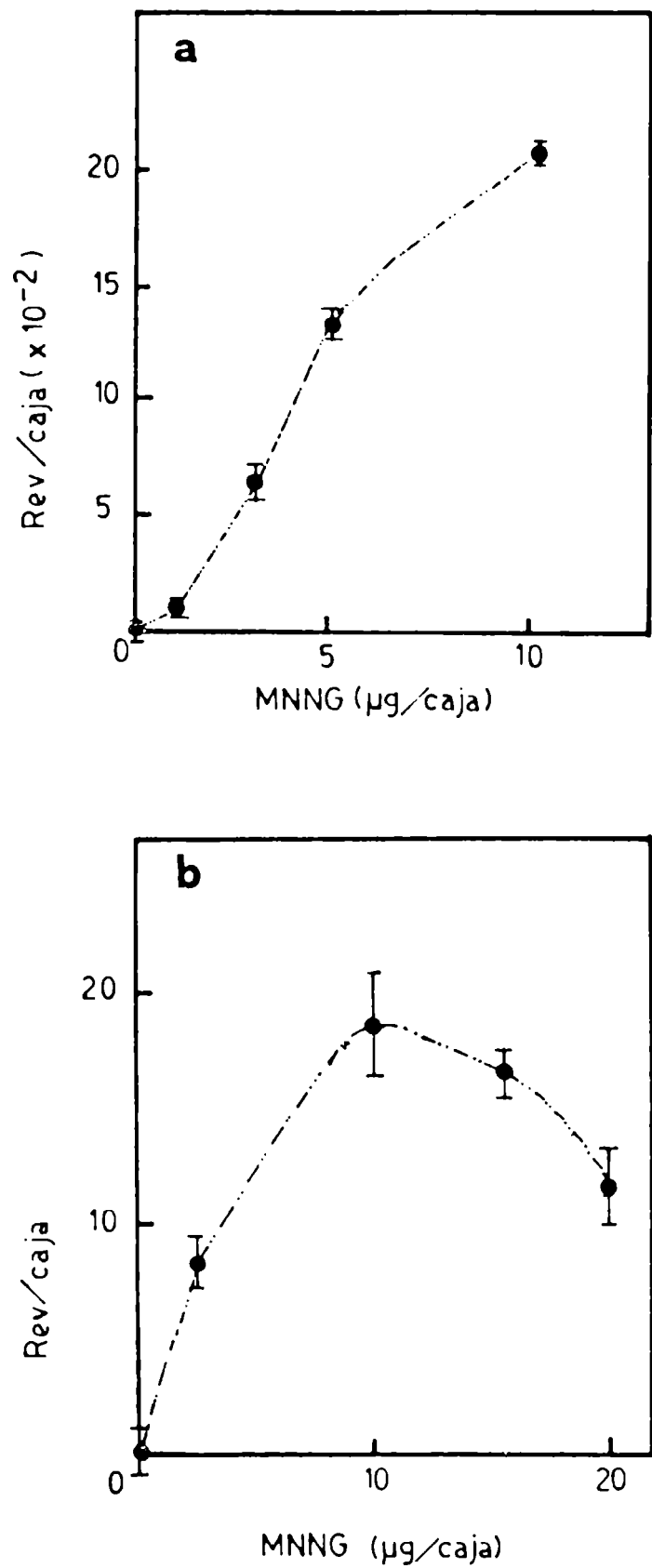


En la experiencia se mantuvo fija la concentración del extrac-
to S-9_F (150 $\mu\text{l/ml}$ de S-9 Mix) y se varió la cantidad de NADP en la
mezcla enzimática.

Las barras indican 1 DS (n = 4).

Figura 3

Curvas dosis-respuesta para las cepas TA1535 y TA1538 con el mutágeno MNNG



Los resultados corresponden al ensayo clásico de Ames con las cepas: TA1535, sin detoxificación (a) y TA1538, con detoxificación (S-9_F : 150 él por ml de S-9 Mix) (b). A cada punto se le restó el valor correspondiente a la reversión espontánea de la cepa (15 rever^u tantes/caja para la cepa TA1535 y 18 para la cepa TA1538).

Las barras indican 1 DS (n = 6).

En la Tabla 2 se compararon los resultados obtenidos para la cepa TA1537 y el mutágeno MNNG con los publicados por Herbold, B. y Buselmaier, W. en el año 1976. En nuestro caso el número de revertantes por caja a bajas concentraciones de droga es mucho mayor, como también resultó mayor la letalidad observada. De esta forma la MNNG empleada por este laboratorio se mostró más efectiva que la empleada por los otros autores.

Sin embargo, cuando tratamos de correlacionar los resultados iniciales con los de Ames, B.N. y colaboradores (1975) para la cepa TA100, encontramos que el número de revertantes obtenido sólo alcanzaba la décima parte del valor reportado (Tabla 3, columna A). Esto se subsanó al emplear otra partida de MNNG con la cual se obtuvieron los resultados que se indican en la columna B de la Tabla 3. Estos resultados reiteran la necesidad de controlar el estado de conservación de los mutágenos, ya que muchos de ellos son altamente inestables.

Cuando la cepa TA100 se ensayó con aflatoxina B₁ (Figura 4a) usando para la detoxificación S-9_A y con benzopireno (Figura 4b) con el mismo tipo de activación, se obtuvo en ambos casos una respuesta lineal. Para el primer ejemplo la pendiente correspondió a la mitad de la esperada de acuerdo a la bibliografía (McCann, J. y colaboradores, 1976) y con el benzopireno sólo se logró la tercera parte del número de revertantes comunicado por otros autores (McCann, J. y colaboradores, 1975a). Al probarse en las mismas condiciones esta droga con la cepa TA98 las discrepancias con los datos bibliográficos fueron del mismo orden (Ames, B.N. y colaboradores, 1973 b) tal como aparece en la Figura 5a.

Los resultados del ensayo de bromuro de etidio con la cepa TA98, empleando S-9_A en la detoxificación, fueron comparables con los publicados por McCann, J. y colaboradores (1975a) (Figura 5b).

Tabla 2

Revertantes de la cepa TA1537 frente al mutágeno MNNG

| MNNG (µg/caja) | Revertantes por caja * | | UFC por milili tro (x 10 ⁻⁸) ** | |
|-------------------|---------------------------|------|--|-------|
| | A | B | A | B |
| 0 | 25 | 10.7 | 1.2 | 1.6 |
| 2 | 700 | 57.7 | 0.9 | 1.5 |
| 20 | 42 | 720 | 0.01 | 0.025 |

A: Resultados obtenidos por nuestro laboratorio.
B: Resultados publicados por Herbold, B. y Buselmaier, H.,
1976.

* Los ensayos se realizaron en presencia de S-9_F (150 µl/
ml de S-9 Mix).
** Corresponde al número de unidades formadoras de colonia
en MMHB con la dosis indicada de MNNG.

Tabla 3

Revertantes de la cepa TA100 frente al mutágeno MNNG

| MNNG (µg/caja) | Revertantes/caja | |
|-------------------|------------------|-------------|
| | A | B |
| 1 | 896 ± 20 | 7900 ± 100 |
| 2 | 1300 ± 60 | 10740 ± 420 |
| 3 | 1300 ± 60 | 12500 ± 790 |
| 5 | 2230 ± 106 | 14700 ± 950 |

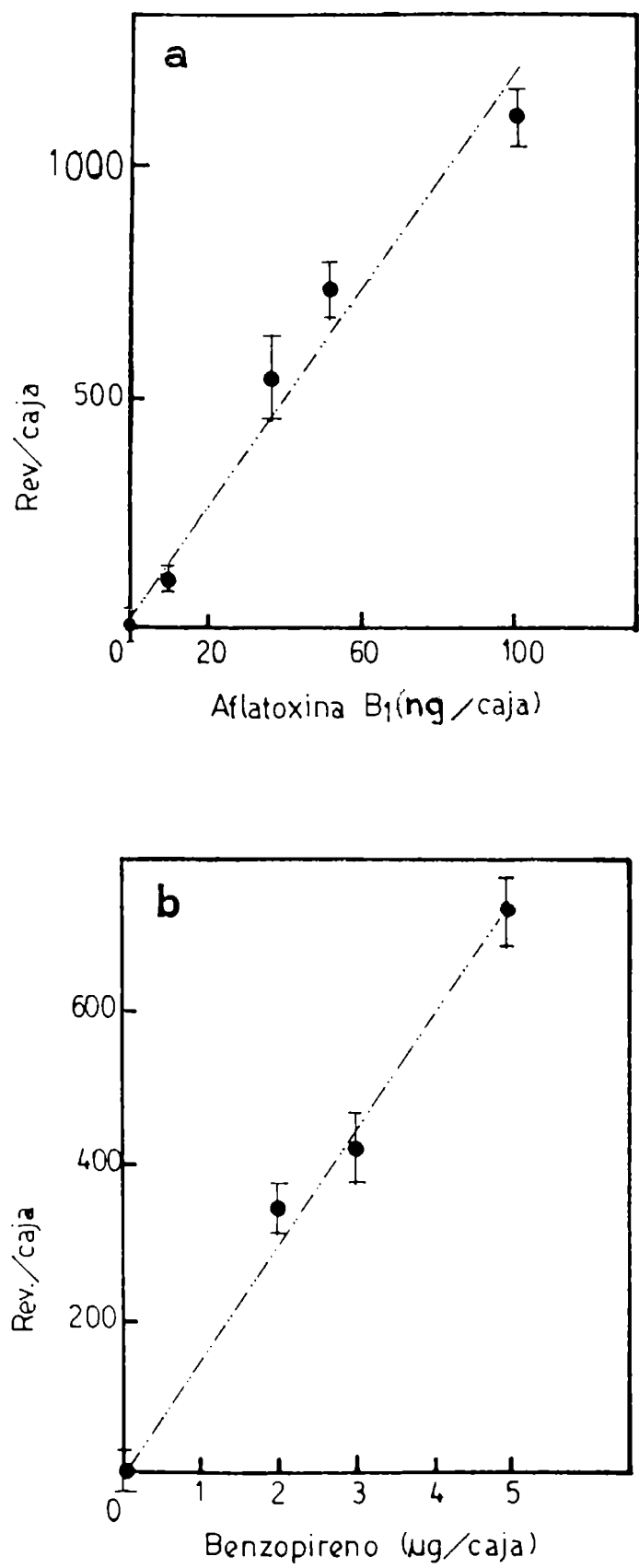
Este ensayo se realizó en ausencia de S-9 porque no requiere activación metabólica.

A y B representan los resultados obtenidos con dos lotes diferentes de MNNG.

En cada punto se indican los valores correspondientes a 1 DS para $4 \leq n \leq 10$.

Figura 4

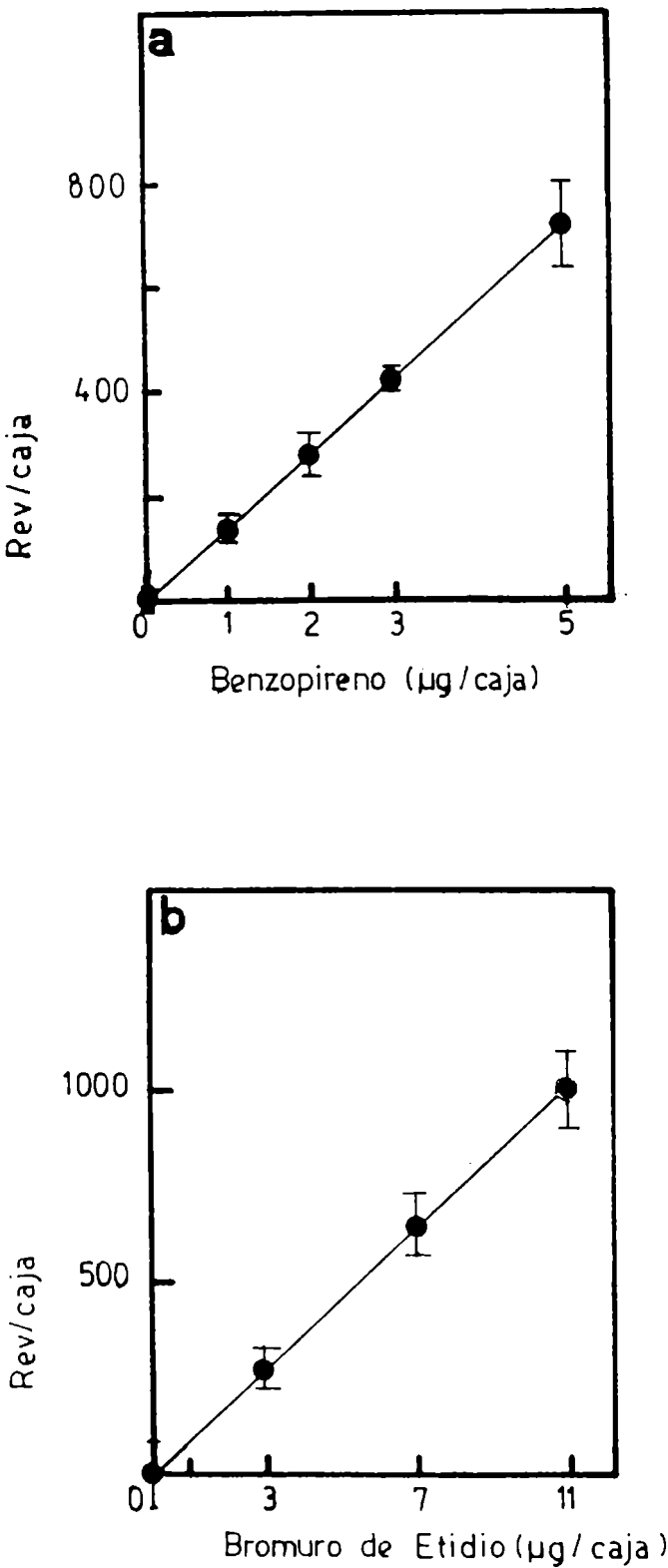
Curvas dosis-respuesta para la cepa TA100 y los mutágenos aflatoxina B₁ y benzopireno.



Se realizó el test de Ames con detoxificación (S-9_A: 50 µl/ml de S-9 Mix) con la cepa TA100 y los mutágenos aflatoxina B₁ (a) y benzopireno (b). A cada punto se le restó el valor correspondiente a la reversión espontánea (120 revertantes/caja).

Figura 5

Curvas dosis-respuesta para la cepa TA98 con los mutágenos benzopireno y bromuro de etidio



Se realizó el test de Ames con detoxificación (S-9_A: 50 µl/ml de S-9 Mix) con la cepa TA98 y los mutágenos benzopireno (a) y bromuro de etidio (b). A cada punto se le restó el valor correspondiente a la reversión espontánea de la cepa (18 revertantes/caja).

Las barras indican 1 DS (n = 6).

De lo antes expresado se puede deducir que las discrepancias obtenidas en nuestros ensayos con los mutágenos aflatoxina B₁ y benzopireno se deben probablemente a la calidad y estado de conservación de las drogas, puesto que tanto la cepa TA98 como la TA100 dieron para otros mutágenos resultados satisfactorios (TA100/MNNG, TA98/bromuro de etidio).

Por otra parte, la concordancia de nuestros resultados con los recogidos de la bibliografía para la cepa TA98 y el mutágeno bromuro de etidio, demuestran que el S-9_A empleado en la detoxificación es activo

4. CONCLUSIONES

Resumiendo lo anteriormente dicho podemos concluir que:

- a. Las cepas conservan las características originales como lo demuestran las pruebas de control de fenotipos.
- b. Las cepas responden correctamente aumentando notablemente la frecuencia de reversión, frente a concentraciones crecientes de sustancias de las cuales se sabe que poseen poder mutagénico.
- c. En las experiencias realizadas con activación metabólica puede observarse que el extracto preparado resultó eficaz para la detoxificación de las drogas ensayadas, obteniéndose resultados comparables con los obtenidos por otros autores.

El buen comportamiento del sistema nos habilitó entonces para encarar la siguiente etapa, ensayando drogas no probadas anteriormente con este método.

APLICACIÓN DEL MÉTODO AL ESTUDIO DE LA FTALIDA DEL ÁCIDO NIFLÚMICO Y DEL ÁCIDO NIFLÚMICO

Para estudiar si mostraban comportamiento mutagénico se probaron con el test de Ames la ftalida del ácido niflúmico y el ácido niflúmico.

1. COMPORTAMIENTO DE LA FTALIDA DEL ACIDO NIFLUMICO

Aplicando el método clásico de Ames se probaron las dosis de 5, 50 y 500 μg por caja de FAN.

Para los ensayos con detoxificación se preparó el extracto microsómico a partir de ratas tratadas con Aroclor (S-9_A) y éste se utilizó a una concentración de 50 μl por mililitro de S-9 Mix.

Cómo se observa en la Tabla 4, para las cinco cepas probadas no apareció un incremento en el número de revertantes por caja, con respecto a los controles sin droga.

Tampoco se observó variación en el número de U.F.C. en presencia de droga con el aumento de la dosis. De esta forma la FAN no mostró comportamiento mutagénico en nuestro sistema y la viabilidad de las bacterias en la caja no se vio alterada por la incorporación de droga.

En la Tabla 5 se reproducen los límites de confianza para el 99.9% de los casos (CL_d 99.9%). Este valor define el entorno dentro del cual fluctúan las diferencias entre las revertantes por caja observadas, para la dosis de 500 μg , y la que corresponde a la reversión espontánea ($\bar{X}_{500} - \bar{X}_0$).

De la comparación de estos datos con los valores medios del control (\bar{X}_0) surge que en todos los casos la diferencia para las revertantes observadas con las dosis de 0 μg y 500 μg por caja, no supera el valor de \bar{X}_0 .

De forma que si, tal como lo sugiere Ames, tomamos como límite inferior para considerar la respuesta positiva el que

CAPITULO II

APLICACION DEL METODO AL ESTUDIO DE LA
FTALIDA DEL ACIDO NIFLUMICO Y DEL
ACIDO NIFLUMICO

Tabla 4

Dosaje del poder mutagénico de la ftalida del ácido niflúmico

| Cepa | Activación | Dosis (µg/caja) | Revertantes/ caja (1) | U.F.C. x 10 ⁻⁶ | |
|--------|------------------|--------------------|--------------------------|---------------------------|-----|
| | | | | (1) | (2) |
| TA1535 | - | 0 | 14 | 180 | |
| | | 5 | 12 | 210 | |
| | | 50 | 11 | 160 | |
| | | 500 | 14 | 180 | |
| | S-9 _A | 0 | 12 | | |
| | | 5 | 11 | | |
| | | 50 | 13 | | |
| | | 500 | 18 | | |
| TA1537 | - | 0 | 12 | 170 | |
| | | 5 | 11 | 120 | |
| | | 50 | 10 | 120 | |
| | | 500 | 13 | 110 | |
| | S-9 _A | 0 | 14 | | |
| | | 5 | 12 | | |
| | | 50 | 9 | | |
| | | 500 | 8 | | |
| TA1538 | - | 0 | 18 | 170 | |
| | | 5 | 11 | 130 | |
| | | 50 | 21 | 180 | |
| | | 500 | 18 | 120 | |
| | S-9 _A | 0 | 15 | | |
| | | 5 | 18 | | |
| | | 50 | 19 | | |
| | | 500 | 13 | | |
| TA98 | - | 0 | 21 | 180 | |
| | | 5 | 26 | 200 | |
| | | 50 | 21 | 160 | |
| | | 500 | 22 | 160 | |
| | S-9 _A | 0 | 22 | | |
| | | 5 | 19 | | |
| | | 50 | 15 | | |
| | | 500 | 21 | | |
| TA100 | - | 0 | 98 | 170 | |
| | | 5 | 94 | 125 | |
| | | 50 | 92 | 140 | |
| | | 500 | 115 | 160 | |
| | S-9 _A | 0 | 102 | | |
| | | 5 | 109 | | |
| | | 50 | 130 | | |
| | | 500 | 132 | | |

(1) Cada valor corresponde al promedio de 6 cajas.

(2) U.F.C. = unidades formadoras de colonias por ml, de fenotipo no seleccionado (medio MMHB), en presencia de la dosis indicada de droga.

Tabla 5

Análisis estadístico de los resultados obtenidos en el estudio del comportamiento de la ftalida del ácido niflúmico

| Cepa | CL _d (99,9%)* | Valor medio de la reversión espontánea (Revertantes/caja) |
|--------|--------------------------|--|
| TA1535 | 9.9 | 13 |
| TA1537 | 8.5 | 12 |
| TA1538 | 6.0 | 10 |
| TA98 | 5.5 | 24 |
| TA100 | 43.0 | 104 |

El análisis se realizó en base a los resultados obtenidos en tres experiencias, una de las cuales se presenta en la Tabla 4, con un total de 36 cajas computadas para la dosis de 500 µg por caja y 18 para 0 µg por caja.

* Corresponde al límite de confianza para la diferencia entre los valores medios de las revertantes obtenidas frente a la dosis de 500 µg/caja, con los del control, en el 99,9% de los casos.

corresponde al doble de la reversión espontánea ($2\bar{X}_0$), podemos afirmar que con $p < 0.001$ la FAN se comporta como no mutagénica para el sistema. Para ese grado de significación se cumple que: $\bar{X}_{500} - \bar{X}_0 < \bar{X}_0$ (Ver análisis estadístico).

2. COMPORTAMIENTO DEL ACIDO NIFLUMICO

Con el mismo protocolo que en el punto anterior, se ensayaron 500 μg por caja de AN. Para los ensayos con detoxificación se realizaron duplicados empleando dos preparaciones independientes de extracto, a una concentración de 50 μl por mililitro de S-9 Mix.

Nuevamente en este caso el número de revertantes por caja obtenido para las cinco cepas probadas, no se incrementó al aumentar la dosis (Tabla 6). Sin embargo, para la cepa TA1535 se encontró que sólo el 50-60% de la población original era capaz de formar colonias en presencia de 500 μg por caja de AN. Este efecto tóxico no pareció afectar el número de revertantes por caja, que se mantuvo en niveles comparables a los del control.

Por lo dicho consideramos que para comparar la población correspondiente a la dosis de 500 μg por caja con la población control, era necesario tener en cuenta el descenso de viabilidad observado.

Tomamos entonces como factor de corrección por muerte (FC), al cociente entre el número de U.F.C. en condiciones normales, y el número de U.F.C. en presencia de 500 μg por caja de AN.

Obtuvimos así lo que sería una estimación del número de revertantes que correspondería al 100% de sobrevivientes.

Para determinar el grado de significación de los resultados obtenidos con esta cepa, usamos los valores de revertantes hallados en cada caja, corregidos con el F.C. promedio de cada experimento

Tabla 6

Determinación de poder mutagénico para 500 µg/caja de ácido niflúmico

| Cepa | Activación (1) | Dosis (µg/caja) | Revertantes/ caja (2) | U.F.C x 10 ⁻⁶ (2) (3) |
|--------|-------------------|--------------------|--------------------------|-------------------------------------|
| TA1535 | - | 0 | 13 | 150 |
| | | 500 | 12 | 80 |
| | a | 500 | 14 | |
| | b | 500 | 13 | |
| TA1537 | - | 0 | 5 | 490 |
| | | 500 | 6 | 400 |
| | a | 500 | 6 | |
| | b | 500 | 5 | |
| TA1538 | - | 0 | 26 | 370 |
| | | 500 | 26 | 300 |
| | a | 500 | 25 | |
| | b | 500 | 27 | |
| TA98 | - | 0 | 32 | 210 |
| | | 500 | 27 | 190 |
| | a | 500 | 27 | |
| | b | 500 | 24 | |
| TA100 | - | 0 | 232 | 360 |
| | | 500 | 207 | 330 |
| | a | 500 | 175 | |
| | b | 500 | 228 | |

- (1) Se emplearon las preparaciones (a) o (b) de S-9_A (50 µl/ml de S-9 Mix. (-) Corresponde a los ensayos sin detoxificación.
- (2) Cada valor corresponde al promedio de 6 cajas.
- (3) U.F.C. = unidades formadoras de colonias por ml, de fenotipo no seleccionado (medio MMHB), en presencia de la dosis indicada de droga.

(Tabla 7).

Con las cepas TA1537, TA1538, TA98 y TA100 no se observó disminución en el número de U.F.C. con respecto a los controles, de manera que para el análisis estadístico tomamos directamente el número de revertantes por caja (Tabla 7).

De la comparación del límite de confianza para la diferencia (CL_d), en las condiciones 0 μ g y 500 μ g, con los de \bar{X}_0 , surge que para el caso particular de la cepa TA1535 no se cumple la condición de ser, en el 99.9% de los casos, $\bar{X}_{500} < 2\bar{X}_0$. Para este porcentaje se cumple que $\bar{X}_{500} - \bar{X}_0 > \bar{X}_0$.

Por lo tanto el análisis estadístico pone de manifiesto que sólo el 90% de los casos estarían dentro de la condición fijada para tomar la respuesta como no mutagénica, con lo cual el grado de significación correspondería a $p < 0.1$.

Con estos datos se podría considerar la respuesta a la cepa TA1535 frente al AN como un caso límite de comportamiento mutagénico.

3. ANALISIS ESTADISTICO

El tratamiento estadístico se realizó en base a los valores correspondientes al número de revertantes por caja, obtenidos por la reversión espontánea de las cepas ($12 \leq n \leq 18$) y para la dosis máxima probada (500 μ g/caja) ($n = 36$).

Se estableció el límite de confianza para la diferencia entre los valores medios, de las condiciones 0 y 500 μ g por caja. Para ello se calcularon previamente en ambos casos los cuadrados de las desviaciones standard por la fórmula:

$$s^2 = \frac{\sum x^2 - \frac{(\sum x)^2}{n}}{(n-1)}$$

Tabla 7

Análisis estadístico de los resultados obtenidos en el estudio del comportamiento del ácido niflúmico

| Cepa | CL _d (99.9%) | Valor medio de la reversión espontánea |
|---------|----------------------------|---|
| TA1535* | 18.5** | 12.0 |
| TA1537 | 4.9 | 6.0 |
| TA1538 | 16.8 | 28.0 |
| TA98 | 18.2 | 32.0 |
| TA100 | 98.0 | 231.0 |

Los cálculos se realizaron considerando el total de los datos obtenidos en dos experiencias, con un total de 36 cajas computadas para dosis de 500 µg por caja y 12 para las revertantes espontáneas.

* Para esta cepa las revertantes por caja para la dosis 500 µg se corrigieron por letalidad con el F.C. promedio (ver texto)

** El valor que cumple la condición de ser menor que \bar{X}_0 (reversión espontánea) es válido para el 90% de los casos (CL(90%) = 11.5).

Donde X corresponde al número de revertantes en cada caja y n al número total de cajas.

Con estos datos se calculó el valor de la desviación standard de la diferencia entre las dos condiciones analizadas:

$$\bar{S}_d^2 = \frac{S_1^2}{n_1} + \frac{S_2^2}{n_2}$$

Para el análisis estadístico de los resultados se tomó de los valores del parámetro t (Test de Student), el que corresponde a un nivel de significación de 0.001, grado de libertad mayor que 30 (3.65). En base a este valor se estableció el límite de confianza de la diferencia de valores medios, para experimentos no apareados:

$$CL_d = (\bar{X}_{500 \mu g} - \bar{X}_{0 \mu g}) + t S_d$$

En este test, Ames ha establecido como norma que para que un agente sea considerado como no mutagénico, las reversiones observadas en presencia del mismo deben ser menores que el doble de las espontáneas (0 μg)

En base a esta condición, el criterio aplicado considera que el valor de la diferencia más su límite superior, debe ser menor que el valor de $\bar{X}_{0 \mu g}$ para no ser considerado como mutagénico. Esto ha sido tomado de esta forma porque un incremento igual o mayor que $\bar{X}_{0 \mu g}$ lo incluiría dentro de la categoría de mutagénico.

4. RESPUESTA DE LA CEPA TA1535 AL AN AL CORREGIR POR MUERTE LOS RESULTADOS

En los ensayos previos (ver punto anterior) comprobamos que el comportamiento dudoso del AN sólo se ponía de manifiesto cuando

en el análisis estadístico se utilizaban los valores corregidos por muerte.

Consideramos entonces que al disminuir la viabilidad disminuía en igual medida el número de blancos enfrentados al posible mutágeno. Sería entonces necesario pesar este efecto en la evaluación de las revertantes inducidas por la droga en estudio.

Decidimos entonces probar una dosis más elevada de AN, corrigiendo por muerte los resultados. Para esto determinamos el número de U.F.C. en presencia de droga, por dilución y recuento en placa (ver Materiales y Métodos).

En base a los datos obtenidos realizamos la estimación de la disminución de viabilidad, que ocurría en las cajas para determinación de revertantes. Aceptamos para ello que las condiciones en las que se realizaban las dos determinaciones (titulación y reversión), eran semejantes (más adelante discutiremos la validez de estas afirmaciones).

Fijamos así el factor de corrección, para cada dosis de droga, como el cociente:

$$F.C. = \frac{U.F.C. \text{ (sin droga)}}{U.F.C. \text{ (con droga)}}$$

La normalización de datos se realizó multiplicando el número de revertantes por caja por el factor promedio, que corresponde a la dosis ensayada.

En la Tabla 8 pueden observarse los resultados obtenidos por el método clásico de Ames (cultivo en fase estacionaria y revertantes por caja como valor absoluto) y el incremento que aparece en el número de revertantes para 400 y 800 µg por caja de AN, cuando estos se corrigen de la forma descripta anteriormente.

Aquí se pone de manifiesto que al corregir los resultados por letalidad, para la dosis de 800 µg por caja, el valor medio supera

Tabla 8

Dosaje del poder mutagénico del ácido niflúmico con la cepa TA1535 aplicando la corrección por muerte

| | | | |
|------------------------|-----------------|-----------------|-------------------|
| Dosis (µg/caja) | 0 | 400 | 800 |
| Títulos (bacterias/ml) | 9×10^8 | 5×10^8 | 1.4×10^8 |
| Revertantes/caja | 12 | 11 | 7 |
| Rev./caja (x F.C.) | 12 | 19.8 | 45^{**} |
| D.S.* | 3.3 | 4.5 | 8.1 |

El ensayo se realizó en la forma descripta por Ames para los ensayos sin detoxificación (ver Materiales y Métodos). Las bacterias empleadas provenían de un cultivo en fase estacionaria.

* D.S.: Corresponde al valor de la desviación standard calculada en base a los valores individuales corregidos por el factor promedio(F.C.) (n = 6).

** Para la dosis de 800 µg/caja el valor corregido indicaría comportamiento mutagénico.

el doble de la reversión espontánea. Por lo tanto en estas condiciones la droga mostraría, para la cepa TA1535, comportamiento mutagénico.

5. CONCLUSIONES

Como hemos visto en los ensayos realizados con la FAN no se observó incremento en la frecuencia de reversión espontánea, en ninguna de las cepas probadas. Por otra parte, la presencia de droga en la caja no pareció afectar el número de U.F.C., que se mantuvieron en niveles comparables a los del control.

El AN en cambio, a la dosis de 500 μ g por caja provocó un descenso en el número de U.F.C. del 40-50% en la cepa TA1535. Sin embargo, este descenso de viabilidad no se manifestó de igual manera en el número de revertantes por caja obtenido para esa dosis.

Si consideráramos entonces la posibilidad de que el efecto tóxico enmascarara al efecto mutagénico y corregíamos los resultados, el grado de significación de los mismos disminuía.

Cuando la dosis de AN en la caja se aumentó a 800 μ g, la letalidad observada se incrementó notablemente, mientras que el número de revertantes por caja sólo acusó una ligera disminución. Por consiguiente, cuando las revertantes se expresaron para el 100% de sobrevivientes, la respuesta fue francamente mutagénica.

Sin embargo, en el transcurso de nuestro trabajo, encontramos variaciones en los sucesivos ensayos, lo que nos sugirió que algunas variables no controladas en el método original podrían tener influencia en la respuesta.

Encaramos entonces el estudio de estas variables y su influencia sobre los resultados obtenidos con la cepa TA1535 y el AN.

CAPITULO III

BUSQUEDA DE CONDICIONES PARA INCREMENTAR
LA SENSIBILIDAD DE LA RESPUESTA EN EL
METODO DE AMES

BÚSQUEDA DE CONDICIONES PARA INCREMENTAR LA SENSIBILIDAD DE LA RESPUESTA EN EL MÉTODO DE AMES

Contando con el caso límite de la cepa TA1535 intentamos optimizar algunas condiciones del ensayo para aumentar la respuesta mutagénica.

Consideramos que un punto importante a tener en cuenta era el estado de crecimiento de los cultivos. En este aspecto, en el protocolo original sólo se fija como parámetro el tiempo de incubación de las bacterias (8 a 16 horas). De esta forma el estado de crecimiento de las mismas se encuentra indeterminado, lo que podría afectar la reproductibilidad del método.

Consideramos también que otro aspecto importante a tener en cuenta era el sistema de activación metabólica empleado.

Como hemos visto en la Introducción, el Aroclor 1254 es un buen inductor del sistema enzimático de oxidasas de función mixta en los animales tratados. Es por esta razón que el extracto preparado con este método de inducción (S-9_A) resulta especialmente indicado en la detoxificación de los hidrocarburos aromáticos policíclicos.

Sin embargo, éste no es el único sistema detoxificante de drogas que podría ser responsable de la transformación de los promutágenos en mutágenos.

Para tener en cuenta la influencia que el tratamiento previo de los animales pudiera tener sobre la eficacia del extracto para la detoxificación del AN, decidimos estudiar distintos tipos de inducción en nuestros ensayos.

1. ESTADO DE CRECIMIENTO DE LOS CULTIVOS

Cuando se realizaron las determinaciones de los títulos de bacterias sobrevivientes en presencia de droga, se encontraron variaciones importantes en los sucesivos ensayos. Se pensó que quizá estas indeterminaciones pudieran deberse a un diferente estado de crecimiento de los cultivos.

Para corroborar esta suposición se realizó un estudio comparativo de la fracción de sobrevivientes para 800 µg por caja de AN. Esta determinación se realizó en muestras tomadas en distintas etapas del crecimiento de un cultivo de la cepa TA1535, creciendo en caldo nutritivo.

Los resultados presentados en la Tabla 9 representan los títulos obtenidos en medio MMHB. Seleccionamos esta condición porque es la que más se aproxima a la de las cajas para determinación de revertantes, pero hemos observado que en este medio los títulos corresponden al 10-20% de los que se obtienen cuando las bacterias diluídas se siembran en medio nutritivo. (Esta variación se debe a que al inocular las bacterias provenientes de un medio rico en un medio mínimo, su desarrollo se encuentra inhibido por las carencias del mismo).

Las bacterias así ensayadas mostraron una mayor sensibilidad a la droga, en la fase logarítmica de crecimiento, como se pone de manifiesto en los bajos porcentajes de sobrevivientes obtenidos en esta etapa (Tabla 9).

Teniendo en cuenta estos aspectos del comportamiento del sistema, se decidió realizar todos los ensayos de mutagénesis con las bacterias creciendo en fase exponencial, a $D.O_{500} = 0.7$. Asimismo se determinó la fracción de bacterias sobrevivientes para cada dosis de droga y en base a estos valores se corrigieron los resultados de la forma descripta, quedando expresados los mismos para el 100% de bacterias sobrevivientes.

En la Tabla 10 reproducimos los resultados obtenidos para las dosis de 500 y 800 µg de AN por caja. Los datos muestran que los porcentajes de sobrevivientes disminuyen en forma marcada al aumentar la dosis. Por otra parte, el número de revertantes por caja se mantiene en valores comparables a los del control para la

Tabla 9
Letalidad del AN para la cepa TA1535 según el estado de crecimiento
del cultivo

| D.O. ₅₀₀ | N ₀ | N ₈₀₀ | Porcentaje de sobrevivientes* | Fase de crecimiento |
|---------------------|-----------------------|-----------------------|-------------------------------|---------------------|
| 0,73 | 3,4 x 10 ⁸ | 1,7 x 10 ⁶ | 0,5 | logarítmica |
| 0,90 | 5,1 x 10 ⁸ | 5,6 x 10 ⁶ | 1,1 | logarítmica tardía |
| 1,10 | 5,8 x 10 ⁸ | 6,2 x 10 ⁶ | 1,1 | logarítmica tardía |
| 1,26 | 5,0 x 10 ⁸ | 1,0 x 10 ⁷ | 2,0 | estacionaria |
| 1,50 | 5,2 x 10 ⁸ | 1,9 x 10 ⁷ | 3,6 | estacionaria |

De un cultivo creciendo en caldo nutritivo (tiempo de duplicación 45 minutos) se tomaron muestras a distintos valores de D.O.₅₀₀ y se titularon en MMHB.

N₀: U.F.C. en ausencia de AN, por mililitro de cultivo.

N₈₀₀: U.F.C. en presencia de 800 µg de AN, por mililitro de cultivo.

* Porcentaje de sobrevivientes en presencia de 800 µg de AN por caja

$$\left(\frac{N_{800}}{N_0} \times 100\right).$$

Tabla 10

Determinación del comportamiento de la cepa TA1535 frente a 500 y 800 µg de ácido niflúmico por caja

| | | | |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Dosis (µg/caja) | 0 | 500 | 800 |
| Títulos (bact./ml) | 3×10^8 | 4×10^6 | 2×10^6 |
| Rev./caja | 14 | 10 | 8 |
| Rev./caja x F.C. | 14 | 750 | 1320 |
| D.S.* | 2.4 | 150 | 220 |

Las determinaciones se realizaron con bacterias provenientes de un cultivo en fase logarítmica de la cepa TA1535 (D.O. = 0.7 unidades).

* Se calculó la D.S. en base a los valores individuales corregidos con el F.C. promedio ($4 \leq n \leq 6$).

dosis de 500 μg , con tendencia a disminuir cuando esta aumenta a 800 μg . Es decir que de acuerdo a los datos obtenidos aplicando la corrección por muerte y empleando las bacterias en fase logarítmica, se debería considerar al AN como una droga altamente mutagénica.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que en las cajas con trazas de histidina (MMA) se inoculan 2×10^7 bacterias totales, las que realizan varias duplicaciones en la caja hasta consumir todo el aminoácido. De esta forma se obtiene una pátina de microcolonias sobre la que aparecen las colonias His^+ , luego de las 48 horas de incubación. Es de esperar que cuando una droga ejerza un efecto tóxico marcado se observe una disminución apreciable de esta pátina (Ames, B.N. y colaboradores, 1975). A pesar de esto, la observación microscópica de esta población no mostró diferencias con el control en los ensayos con AN, aún para una dosis tan tóxica como la de 800 μg por caja.

2. INFLUENCIA DEL SISTEMA DE DETOXIFICACION

Al estudiar la influencia del tipo de inducción sobre la eficacia del extracto microsómico, consideramos la posibilidad de que el AN pudiera ser capaz de inducir una respuesta específica en el hígado de las ratas. De manera que se preparó un lote de extracto a partir de animales tratados con una dosis masiva de esta droga. Al S-9 así obtenido le llamamos S-9_N.

Preparamos además S-9_A y un lote de S-9, a partir de animales sin tratamiento, al que denominamos S-9₋.

Cada preparación se realizó a partir de 15 ratas Sprage Dawley de 350 gramos de peso para disminuir las variaciones individuales, empleando el método de inoculación más apto (ver Materiales y Métodos).

Determinación del comportamiento de varios S-9 con el mutágeno bromuro de etidio

Para tener una orientación previa sobre las características de los extractos preparados, elegimos al mutágeno bromuro de etidio, cuyo metabolismo es realizado por el sistema de oxidasas de función mixta (Mc Gregor, J.T. y Johnson, I.J., 1977). Probamos así una dosis activa de este mutágeno con la cepa TA98 (McCann, J. y colaboradores, 1975a) enfrentándolo a los distintos tipos de extractos preparados (Figura 6).

Como era de esperar, por ser el Aroclor el inductor más eficaz del citocromo P_{450} , el mayor número de reversiones se obtuvo para S-9_A. En este ensayo, el número de revertantes por caja obtenido usando la cantidad óptima de extracto, resultó entre tres y cuatro veces mayor que el que obtuvimos en la puesta a punto del método, en condiciones semejantes, y superó también el valor reportado por otros autores (McCann, J. y colaboradores, 1975a)

En el caso de S-9₋ la respuesta fue de aproximadamente el 3% de la obtenida con S-9_A y para el S-9_N la eficiencia fue aún menor.

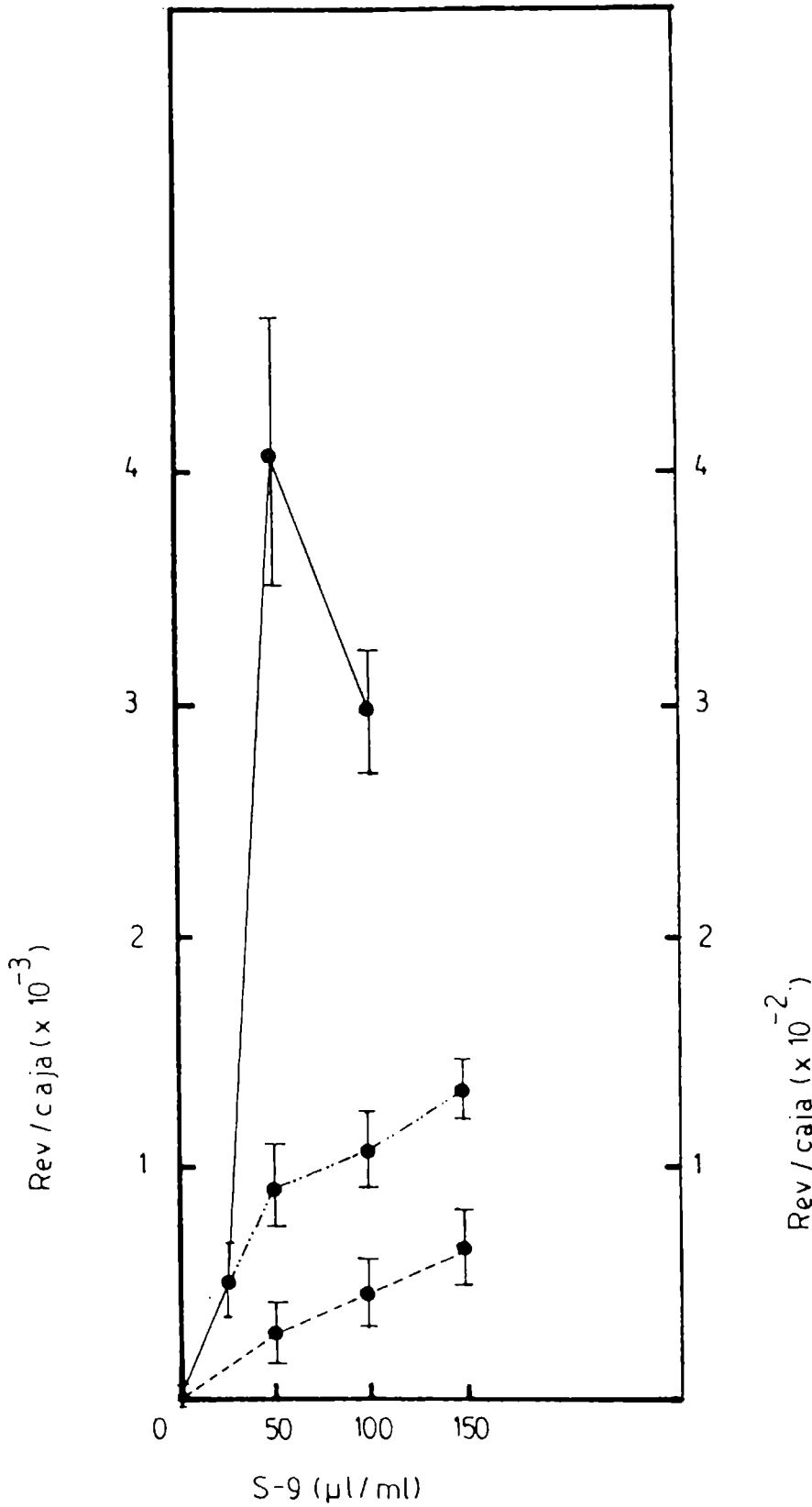
El análisis de los resultados nos conduce a pensar que el tratamiento previo de las ratas con AN produce una modificación en el contenido enzimático del hígado, que hace que el extracto obtenido con este tipo de activación se comporte con menor eficiencia que el proveniente de animales sin tratamiento.

Estudio de la influencia de los distintos S-9 en la respuesta de la cepa TA1535 al ácido niflúmico

Elegimos la dosis de 800 µg de ácido niflúmico por caja para estudiar el comportamiento de la cepa al variar la cantidad de

Figura 6

Efecto de tres tipos diferentes de extractos microsómicos en la detoxificación del bromuro de etidio



Se ensayó la cepa TA98 frente a 5 µg de bromuro de etidio por caja con las cantidades indicadas de S-9_A (—), S-9_N (---) y S-9₋ (-·-·-).

La escala de la izquierda corresponde a la curva para S-9_A y la de la derecha para S-9_N y S-9₋. Se restó a cada punto 20 revertantes que corresponden a la reversión espontánea de la cepa.

Las barras indican 1 DS (n = 4).

extracto.

En este punto se consideró la posibilidad de que el S-9 transformara a la droga en un derivado menos tóxico para las bacterias, de manera que determinamos también el número de U.F.C. frente a 800 µg de AN, para diferentes concentraciones de extracto.

Las bacterias provenientes de un cultivo en fase logarítmica ($DO = 0.7$) se sembraron con un factor de 10^4 en MMHB, con lo cual el número de bacterias incorporado fue de aproximadamente 3×10^4 bacterias. Conjuntamente se agregó el S-9 y 800 µg de AN por caja. El recuento de las colonias obtenidas corresponde entonces al número de U.F.C. en presencia de droga. En base a estos datos se calcularon los porcentajes de sobrevivientes.

Los resultados obtenidos se reproducen en la Figura 7a. La tendencia general es aumentar el número de sobrevivientes al AN al aumentar la cantidad de S-9 en el S-9 Mix.

En este sentido el S-9_N, en la concentración de 50 µl/ml de S-9 Mix, muestra el doble de la eficacia presentada por el S-9_A y el S-9₋. Al aumentar las concentraciones la efectividad de los tres extractos tiende a equipararse y cuando la concentración es de 150 µl/ml, los sobrevivientes obtenidos con los tres tipos de activación son comparables.

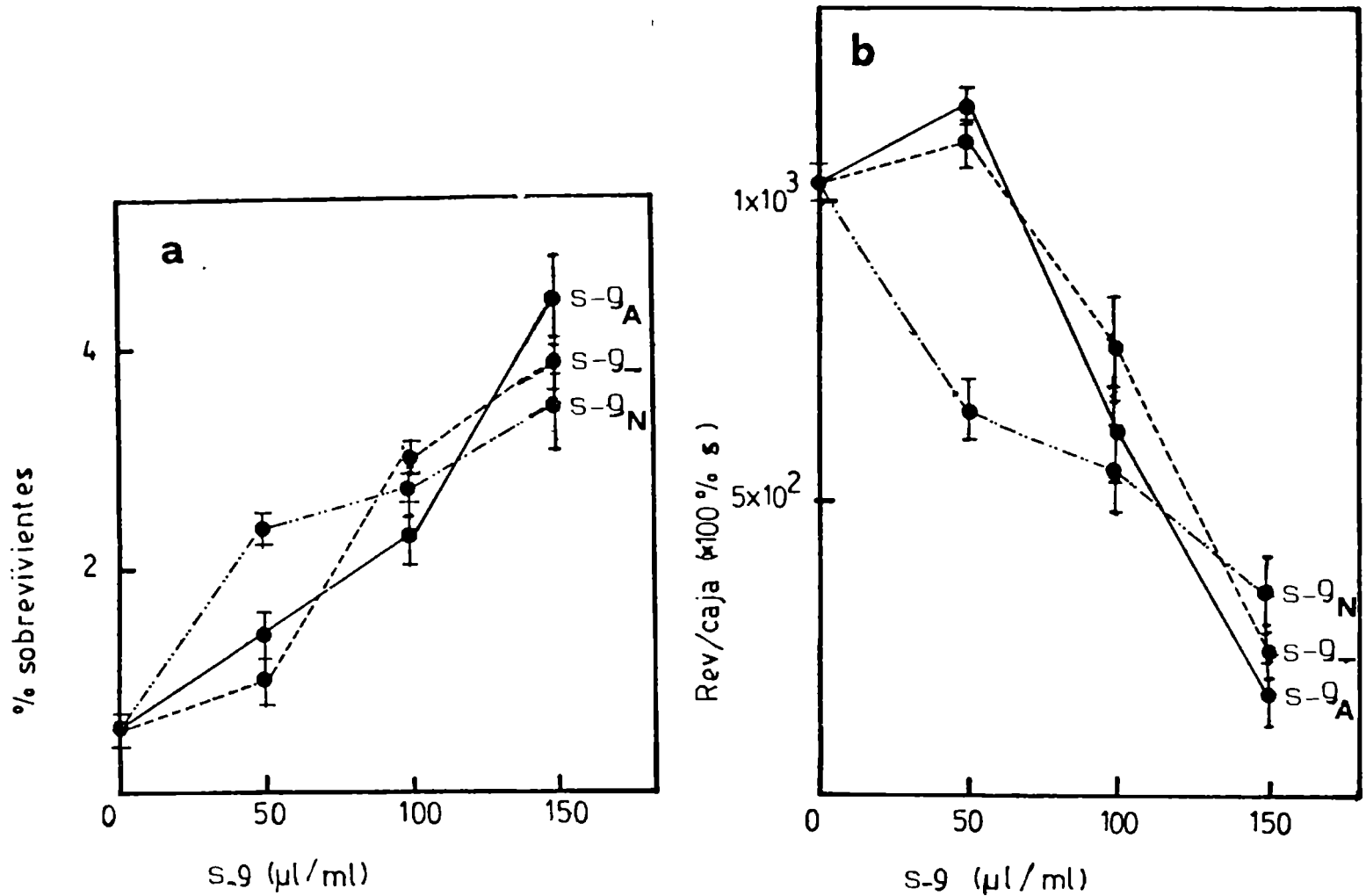
En este caso particular, la inducción con Aroclor no parece haber influenciado el sistema de detoxificación, ya que el comportamiento de S-9_A es semejante al del extracto preparado a partir de ratas sin tratamiento.

Para los tres extractos el número de revertantes no acusó variación marcada con el aumento en la concentración del S-9. Sin embargo, se observó un ligero incremento con respecto al resultado obtenido sin extracto (dato no mostrado).

Cuando estos valores se corrigieron por muerte, los revertantes

Figura 7

Respuesta de la cepa TA1535 frente a 800 $\mu\text{g}/\text{caja}$ de ácido niflúmico empleando tres tipos diferentes de extracto microsómico en la detoxificación



Se determinó el número de U.F.C. en presencia de 800 μg de AN por caja, para las diferentes concentraciones de S-9 indicadas y se calcularon los porcentajes de sobrevivientes tomando como 100 el número de unidades formadoras de colonias en las cajas sin S-9 (a). Con estos porcentajes se corrigió el número de revertantes obtenidos en las mismas condiciones (b).

Las barras indican 1 DS ($n = 6$).

para el 100% de sobrevivientes que resultan son los de la Figura 7b. La disminución de la letalidad observada al incorporar el S-9 a la caja, se manifiesta en la disminución de las revertantes corregidas por muerte. Es decir que las variaciones obtenidas están condicionadas a la toxicidad observada y dependen del factor de corrección calculado en base a ella.

3. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en la evaluación de la toxicidad del AN ponen de manifiesto una mayor sensibilidad de las bacterias a la droga, cuando se encuentran en fase logarítmica de crecimiento. En este período es cuando se obtienen los menores porcentajes de U.F.C. en presencia de droga.

En este mismo sentido el S-9 parece ejercer un efecto detoxificante del AN, disminuyendo los niveles tóxicos de esta droga en el medio. El pretratamiento de los animales con el AN parece modificar los niveles enzimáticos en el S-9, de modo que la efectividad en la detoxificación a bajas concentraciones de extracto, es mayor para el S-9_N que para el caso de S-9₋ y el de S-9_A.

Si consideramos que la toxicidad observada produce una disminución en el número de blancos y aceptamos la validez de la corrección realizada, la respuesta para esta cepa se debería considerar como positiva, con lo cual el AN se debería incluir dentro del grupo de drogas mutagénicas.

Sin embargo, tal como lo destacamos anteriormente, a pesar de los bajos porcentajes de sobrevivientes calculados en base a las titulaciones, la población de microcolonias que crece en presencia de 800 µg de AN por caja no parece acusar un efecto tóxico tan marcado.

Cuando se incorporó el S-9, la disminución de la toxicidad

se reflejó en una disminución del mismo orden en el número de re-
vertantes expresado para el 100% de sobrevivientes.

Estas ambigüedades sugirieron que los ensayos realizados e-
ran insuficientes para extraer una conclusión sobre el comporta-
miento del AN y por lo tanto planificamos nuevas experien-
cias para definir las características de esta droga.

CAPITULO IV

DETERMINACION DE PODER MUTAGENICO EN MEDIO LIQUIDO

DETERMINACIÓN DE PODER MUTAGÉNICO EN MEDIO LÍQUIDO

El método a que se debe recurrir para evaluar la toxicidad de la droga en la caja presenta algunas limitaciones que podrían afectar la validez de los valores calculados.

Como hemos visto en el capítulo anterior, para determinar el porcentaje de sobrevivientes se debe sembrar una dilución apropiada de bacterias, juntamente con la droga, en cajas con medio completo (MMHB). La dilución elegida es aquélla que permita contar entre 100 y 300 colonias luego de la incubación, es decir a consecuencia de la acción tóxica de la droga en estudio. De esta forma, en los ensayos con el AN, para la dosis de 800 μg por caja, debimos incorporar aproximadamente $2-3 \times 10^4$ bacterias. De éstas sólo alrededor del 0,5-1% fue capaz de formar colonia en presencia de esa dosis.

Por otra parte, para determinar el número de revertantes incorporamos aproximadamente $2-3 \times 10^7$ bacterias junto con la droga en el medio MMA (ver Materiales y Métodos). Las trazas de histidina presentes en este medio permiten a la población, uniformemente distribuída en la superficie del agar, crecer hasta alcanzar un número de aproximadamente $2-8 \times 10^9$ bacterias. Sobre esta pátina formarán colonia sólo aquellas mutantes que no requieran del aminoácido para crecer (Malaveille, C. y colaboradores, 1977).

Por lo visto, el número de células que se enfrentan a la droga en esta última condición es aproximadamente 10^3 veces mayor que la que corresponde a la de las cajas con medio MMHB. La toxicidad de la droga podría entonces depender del número de individuos que se enfrentan a ella. (Esta suposición sería aceptable por ejemplo, en el caso de una detoxificación por parte de las bacterias).

Al enfrentarse las bacterias a la droga bajo condiciones diferentes, se podría obtener un comportamiento también diferente.

En nuestros ensayos encontramos apoyo a esta suposición, por la semejanza observada en la pátina de microcolonias, para la dosis

de 800 μg , con respecto al control. Esto resultaría sorprendente si se tiene en cuenta que para esa dosis la tasa de mortalidad es del 99%.

Un dato importante, que obtuvimos en el transcurso de nuestras experiencias y que sirvió en parte para definir el camino a tomar, fue la "no variación" observada en el número de revertantes por caja, con el aumento del número de bacterias iniciales. Comprobamos experimentalmente, como se muestra en la Tabla 11, que el número de colonias His^+ obtenido en el medio selectivo de Ames (MMA) era independiente de la magnitud del inóculo y mostraba valores constantes en el rango probado.

Esto sugirió que el total de colonias His^+ obtenidas en las cajas con trazas del aminoácido, sería el resultado del crecimiento de las revertantes presentes en el cultivo original, más un número adicional de colonias. Estas se formarían a partir de las mutantes que aparecerían, por reversión espontánea, en las duplicaciones realizadas en la caja.

Efectivamente, cuando sembramos 2×10^7 bacterias en dos medios selectivos diferentes, el comportamiento fue también diferente: cuando se permitía a las bacterias realizar algunas duplicaciones en la caja (gracias a la incorporación de trazas del aminoácido selectivo) para un total de 14 cajas computadas, se obtuvo un valor medio de 14 ± 2 colonias revertantes. Sin embargo, cuando se seleccionaba el fenotipo His^+ (cajas sin histidina) para un total de 15 cajas el valor del recuento fue 5 ± 1 .

Es decir, que en el transcurso de las generaciones que realizan las bacterias en las cajas con histidina aparecen nuevas mutantes His^+ . El número final resultante depende del total de individuos que forman la pátina de microcolonias (ver Discusión).

Debemos tener en cuenta que al dosar el número de bacterias

Tabla 11

Influencia del número inicial de bacterias inoculadas en el número de revertantes obtenidas en el medio selectivo de Ames

| Bacterias Inoculadas* | Colonias revertantes (medio con trazas de His)** |
|--------------------------|---|
| 9 x 10 ⁶ | 14 ± 3 |
| 1.2 x 10 ⁷ | 15 ± 3 |
| 3.5 x 10 ⁷ | 16 ± 4 |
| 5.0 x 10 ⁷ | 15 ± 3 |

* Las muestras se sembraron a partir de un mismo cultivo y el valor del inóculo se estimó por el método de dilución y recuento en placa, con medio MMHB.

** Se expresa el número promedio de revertantes/caja ± 1 DS (3 ≤ n ≤ 6)

sobrevivientes estamos evaluando el número de bacterias iniciales, capaces de crecer en presencia de cada dosis de droga. Se establece de esta manera el número de microcolonias que se van a formar en la caja, pero no se puede estimar el número total de individuos que formarán la población después de las 48 horas de incubación. Este número dependerá de las duplicaciones que puedan realizar, hecho que a su vez está condicionado a la disponibilidad de nutrientes en el medio y a la acción tóxica residual del mutágeno.

Por las razones expuestas es indispensable conocer el valor exacto del número de individuos sobre los cuales se cuentan las bacterias His⁺, para que tenga validez la corrección por letalidad.

1. ENSAYO EN MEDIO LIQUIDO

Para salvar este inconveniente diagramamos una técnica capaz de discriminar el efecto tóxico y el mutagénico, permitiendo además, conocer algunos aspectos de la cinética de muerte y/o mutagénesis con que actúa la droga en estudio.

El método propuesto consiste en crecer las bacterias en medio líquido junto con la droga, en condiciones semejantes a las que se usan en las cajas para determinación de revertantes, es decir medio mínimo adicionado de los requerimientos de la cepa (histidina y biotina). De esta manera, la población de bacterias que crece hasta alcanzar la saturación sería equivalente a la que forma la pátina en la caja.

El ensayo en medio líquido permite realizar la determinación de las bacterias totales o de las revertantes His⁺, según el medio selectivo que se emplee. Por otro lado, al llevarse a cabo los controles junto con cada ensayo es posible obtener, con fines comparativos el perfil normal de crecimiento de las revertantes, debido a la duplicación de las mutantes iniciales y a las que

aparecen debido a la mutación espontánea.

En el caso en que la droga sea tóxica, se puede realizar el estudio comparativo de la cinética de muerte ejercida sobre la población total y por otra parte es posible calcular el valor real de la proporción de mutantes en el cultivo sin tener que recurrir a extrapolaciones. Como ya hemos visto, esto no es posible en el método clásico de Ames.

Por otra parte, al seguirse la evolución de los cultivos hasta alcanzar éstos la saturación, se favorece la expresión fenotípica de las mutaciones. Esta condición es fundamental para que se manifieste el comportamiento de algunos mutágenos.

Comportamiento de la MNNG en medio líquido

Para probar la eficacia del método propuesto seleccionamos el mutágeno MNNG, que en el ensayo de Ames daba respuesta positiva frente a la cepa TA1535.

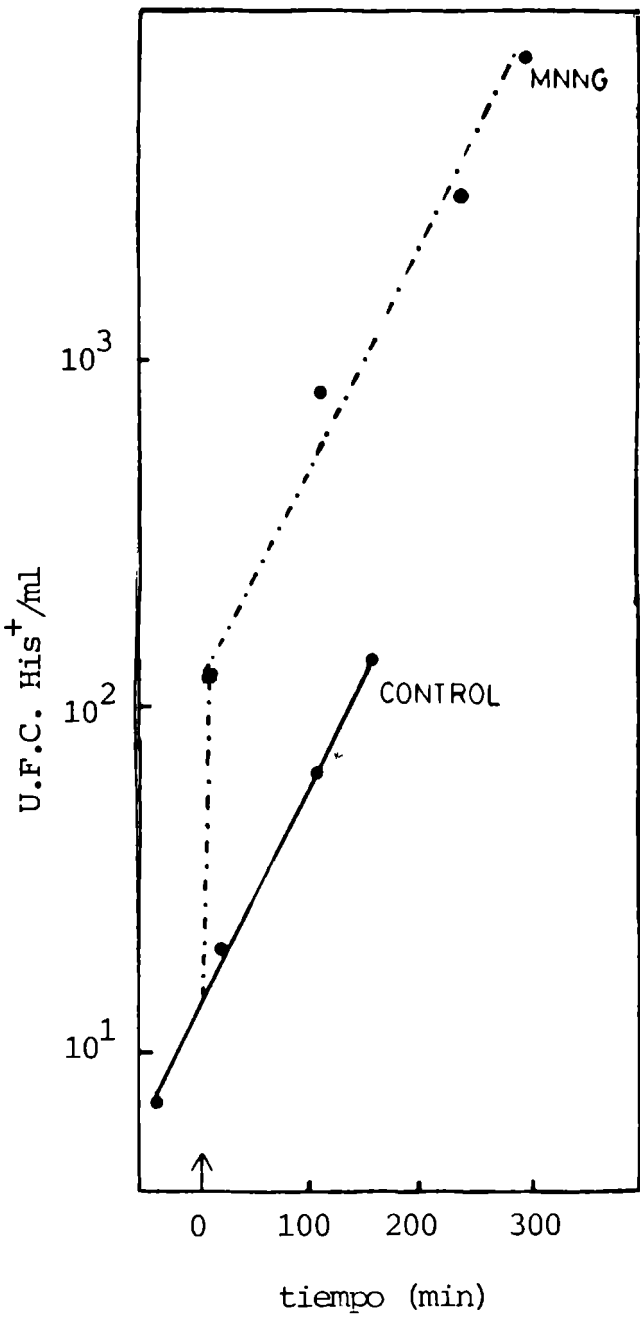
Fijamos la dosis en un rango no tóxico (1 µg/ml) para estudiar la influencia que ejercía sobre las bacterias His⁺ del cultivo. De acuerdo a lo esperado, el incremento de D.O₅₀₀ con el tiempo en el tubo con MNNG fue idéntico al observado en el tubo control, es decir que no se manifestó comportamiento tóxico.

En los 10 primeros minutos de contacto droga-bacteria, el número de revertantes se incrementó 10 veces aproximadamente, lo que demuestra la rapidez con que reacciona esta droga con el DNA de la bacteria (Figura 8).

En esta primera reacción parece consumirse toda la concentración activa de MNNG, ya que a partir de este momento la evolución seguida por las mutantes His⁺ en el cultivo con droga es comparable con la resultante en el tubo control (ver Discusión).

Figura 8

Respuesta de la cepa TA1535 a 1 µg/ml de MNNG en medio líquido



Se midió el desarrollo de las bacterias His⁺ en un cultivo de la cepa TA1535 en medio líquido, en presencia (---) o ausencia (—) de 1 µg/ml de MNNG. Cuando el cultivo original alcanzó una D.O. ≈ 0.2-0.3 unidades, se fraccionó en dos partes y se agregó MNNG al tubo experimental (tiempo 0).

El ácido niflúmico y la cepa TA1535: una respuesta particular

El estudio del AN en el sistema descrito presentó dos características importantes a analizar; por un lado resultó tóxica para las bacterias pero por otro fue posible demostrar que éstas eran capaces de detoxificarla. Debido a esto y para facilitar la interpretación de los resultados, agrupamos éstos según los dos aspectos estudiados.

A. El AN como droga tóxica para el sistema

Efecto sobre las bacterias totales: En el ensayo en medio líquido, que describimos anteriormente, se estudió la viabilidad de la cepa TA1535 en presencia de 400 µg/ml de AN realizando determinaciones antes y después de agregar la droga.

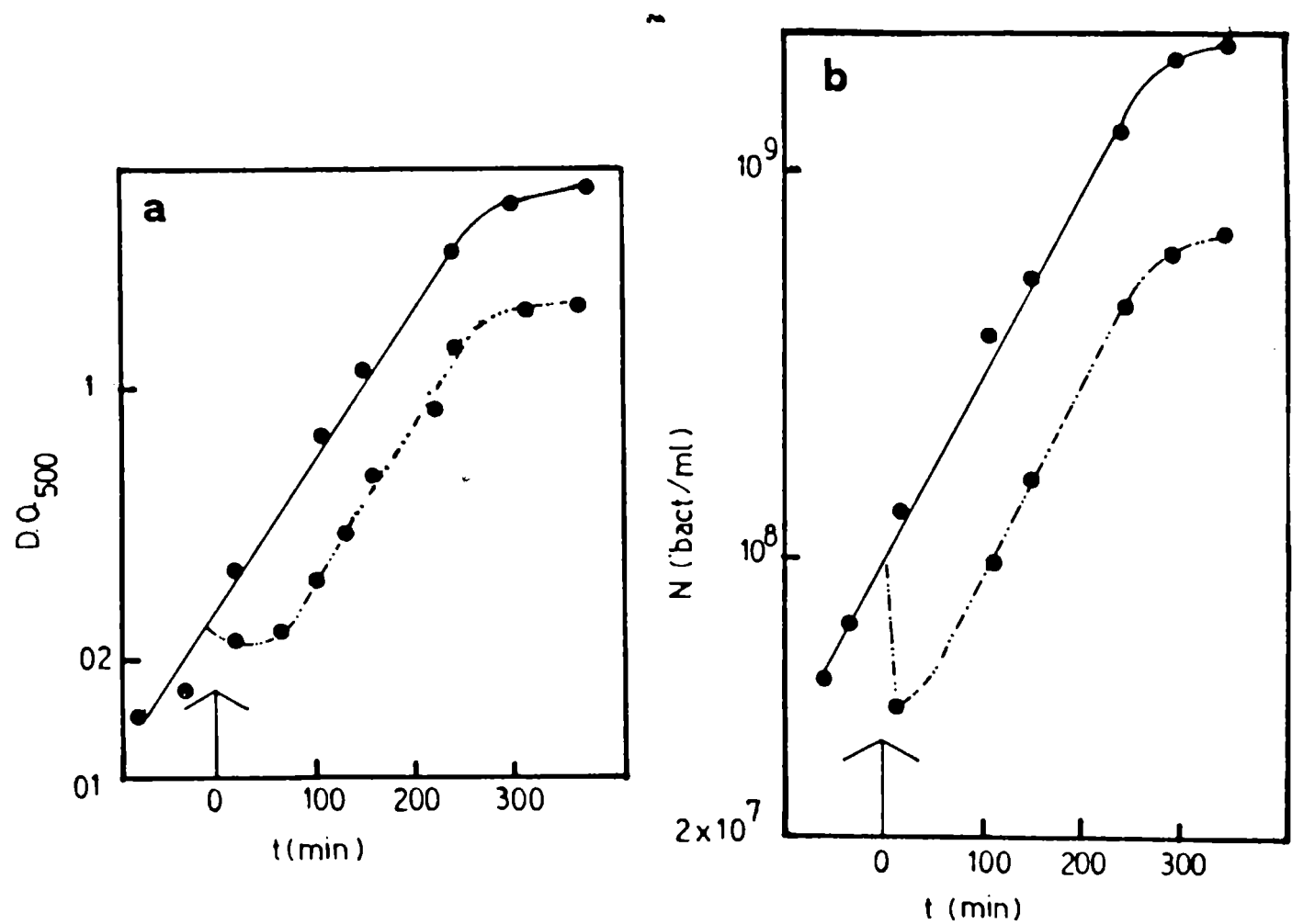
Tomando como parámetro del crecimiento bacteriano el incremento de D.O.₅₀₀ los resultados que se obtienen son los de la Figura 9a. De acuerdo a estos resultados, al incorporar el AN al cultivo se induce en el mismo un período de latencia de 70 a 90 minutos aproximadamente. Después de ese período, el valor de la D.O.₅₀₀ en el tubo con AN, comienza a aumentar con una velocidad semejante a la del control (las rectas de la figura son paralelas). Mientras tanto en el tubo control, la adición del diluyente no parece afectar el crecimiento del cultivo.

La saturación ocurre para ambos cultivos casi simultáneamente, pero los valores alcanzados en el tubo con AN son menores que los del control.

Los resultados obtenidos para la determinación de U.F.C. por ml, en el tubo con AN y en el control, son los de la Figura 9b. En este caso, durante el período de latencia obtenido en la lectura de D.O.₅₀₀ ocurre un descenso del 50-60% en el

Figura 9

Estudio de la viabilidad de la cepa TA1535 en medio líquido frente a 400 μg de ácido niflúmico



Se midió el desarrollo de la cepa TA1535 en medio MMHB (ℓ) crecida en presencia de 400 μg de AN (---) o en ausencia de la droga (—). Cuando el cultivo alcanzó D.C.₅₀₀ \approx 0.2-0.3 unidades se agregó AN al tubo experimental y el solvente DMSO al tubo control. Se midió en los dos casos, (a) D.C.₅₀₀ y (b) U.F.C. por mililitro, en medio MMHB.

número de bacterias viables, originado por el AN . Aproximadamente un total de $6-8 \times 10^7$ bacterias sufren el efecto letal de la droga.

Transcurridos los 70-90 minutos iniciales de contacto, este cultivo parece recuperarse y crece en forma semejante al control. Hemos obtenido esta respuesta reiteradamente cuando el inóculo proviene de un cultivo saturado con no más de 10 horas de incubación.

Cuando las bacterias diluídas al comienzo de la experiencia provienen de un cultivo sobresaturado, la respuesta es diferente: las bacterias parecen no tolerar el agregado de droga y los valores de D.O. permanecen constantes, aún después de 600 minutos de incubación (Figura 10). La falta de "capacidad" de las bacterias para enfrentarse con la droga, no afecta sin embargo el crecimiento en el tubo control. Es así que el desarrollo en ausencia de droga no muestra diferencias con el observado en la condición anterior.

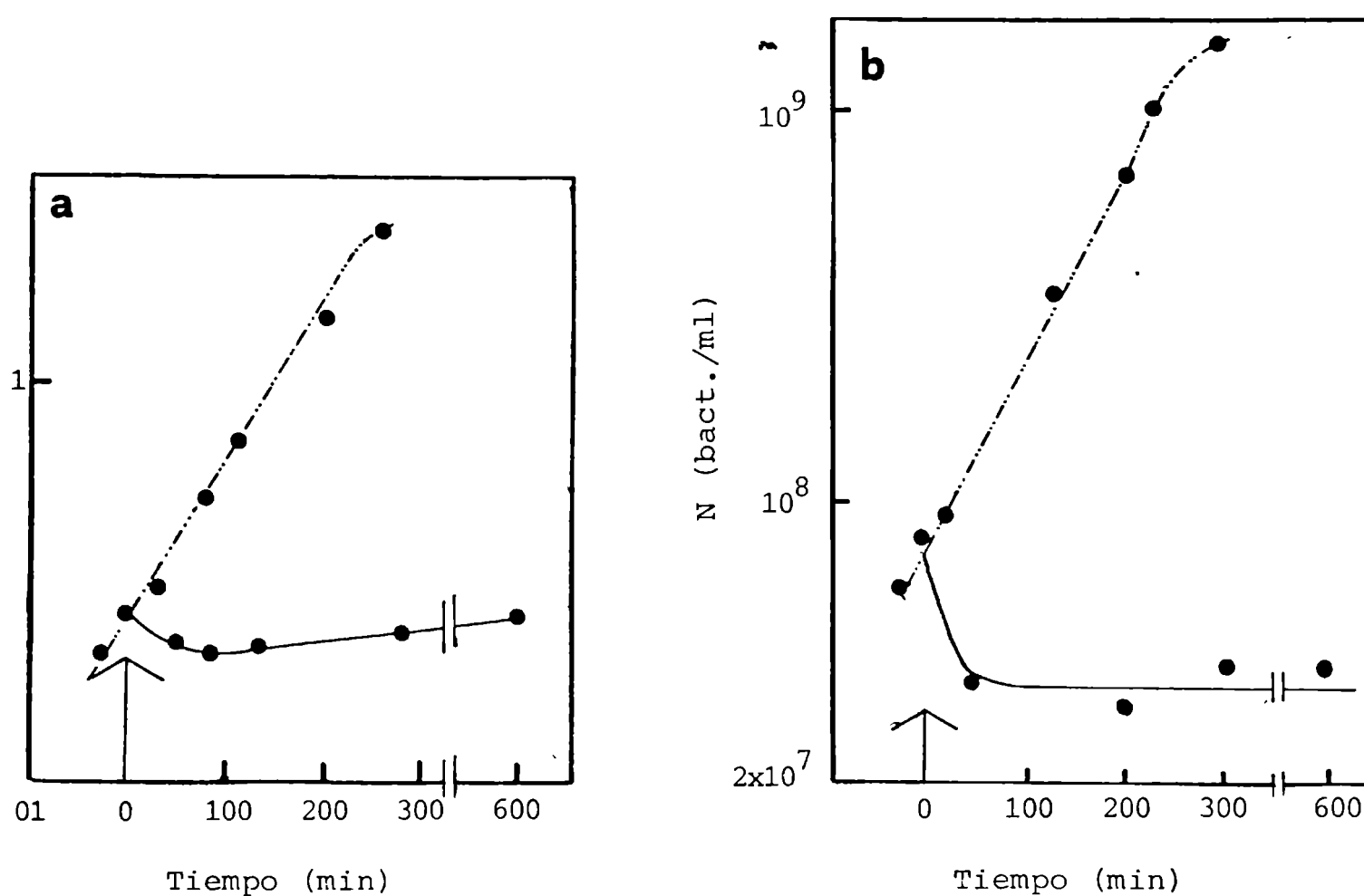
En forma semejante reaccionan aquellos cultivos en los que las bacterias que se enfrentan a la droga se han sometido a temperaturas extremas (cultivo conservado en heladera o calentado a 40°C durante 15 minutos). Esto hace suponer que la causa de este comportamiento sea una situación metabólica desfavorable por parte de las bacterias.

También en estos casos el descenso de viabilidad inicial observado es del 50-60%. La población sobreviviente, si bien no es capaz de replicarse, permanece viable a lo largo del tiempo, y los títulos se mantienen constantes aún después de los 600 minutos de incubación.

Este dato parece demostrar que aún después de ese tiempo la droga permanece en el medio conservando sus propiedades

Figura 10

Estudio de la viabilidad de la cepa TA1535 en medio líquido cuando las bacterias se encuentran en una situación metabólica desfavorable



La experiencia se realizó con la misma metodología que la descrita en la Figura 9, pero las bacterias empleadas provenían de un cultivo sobresaturado (más de 16 horas de incubación). Idéntica respuesta se obtuvo cuando las bacterias se sometieron a condiciones desfavorables (ver texto).

En el cultivo control (---) y en el cultivo crecido en presencia de AN (400 $\mu\text{g/ml}$) (—), se midió (a) D.O.₅₀₀ (b) U.F.C./ml en MMHB.

bacteriostáticas, lo que significa que durante ese lapso permanece estable.

En la Figura 11 representamos los resultados obtenidos en el ensayo en medio líquido, para tres concentraciones diferentes de bacterias que se enfrentan con la droga. Sorprendentemente, el aumento de bacterias en la población, no disminuye el período de latencia, lo que parecería indicar que ese es el tiempo promedio que cada bacteria necesita para lograr la "adaptación" al medio.

Los porcentajes de sobrevivientes tienden a aumentar cuando aumenta el número de bacterias que se enfrentan a la droga y esta variación se debe a que el número que pierde su viabilidad permanece constante ($7-8 \times 10^7$ bacterias/ml).

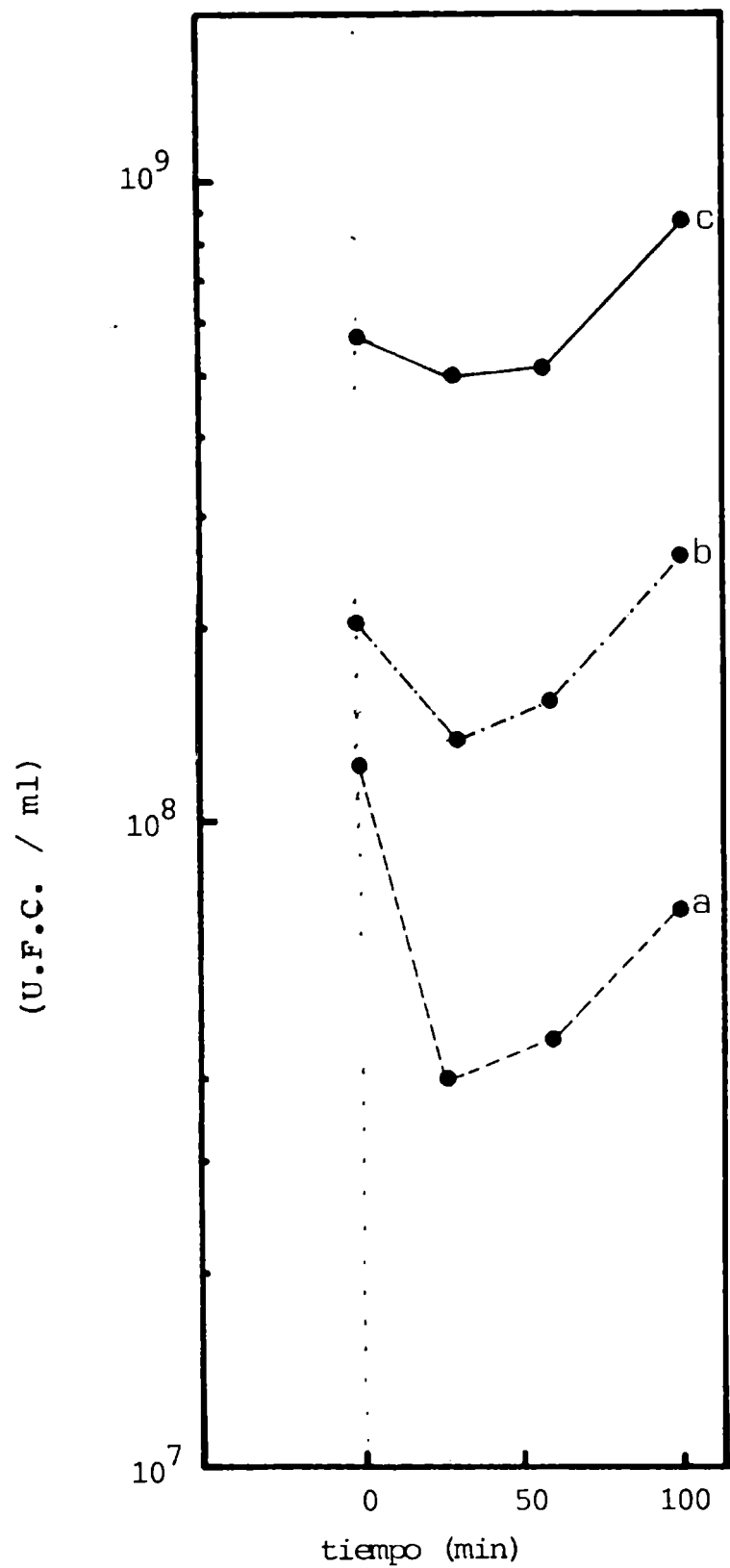
Esto se podría explicar proponiendo una relación estequiométrica droga-bacteria muerta, con independencia de la modificación o no del medio por las bacterias (Figuras 10 y 11).

Los datos presentados podrían explicarse proponiendo que se produjera una selección de mutantes resistentes a AN. Sin embargo, cuando las bacterias que crecen en presencia de 400 µg/ml de AN se titulan en presencia de 800 µg/caja de droga, se obtienen porcentajes de sobrevivientes de 0,1% (Tabla 12). Esta proporción de sobrevivientes es similar a la que se observa cuando las bacterias no fueron pretratadas con AN. Esto se manifiesta tanto cuando el cultivo comienza a recuperar su ritmo normal de crecimiento como después que han transcurrido algunas generaciones.

Con estos datos podemos proponer que la curva de la Figura 9 no se debe a una selección de bacterias genéticamente resistentes al AN. No obstante se plantea la alternativa de que el crecimiento observado pueda deberse a una adaptación al

Figura 11

Estudio del desarrollo de la cepa TA1535 en presencia de ácido niflúmico y la influencia del número inicial de bacterias



Se estudió el desarrollo en medio líquido de tres alícuotas de un cultivo de la cepa TA1535 (fase logarítmica) con diferentes cantidades de bacterias iniciales. Para esto se tomaron las muestras en tres momentos diferentes del crecimiento de las bacterias en fase logarítmica. A cada muestra se le incorporó AN (400 µg/ml) y se estudió la variación del número de U.F.C./ml en medio MMHB. Cada punto corresponde al promedio de 4 cajas. (a) D.O.₅₀₀ inicial ≈ 0.1; (b) D.O.₅₀₀ inicial ≈ 0.2; (c) D.O.₅₀₀ inicial ≈ 0.6.

Tabla 12

Viabilidad de la cepa TA1535 crecida y titulada en
ácido niflúmico

| U.F.C./ml * | |
|---------------------|-----------------------|
| Sin AN | Con 800 µg de AN/caja |
| 4 x 10 ⁷ | 3.9 x 10 ⁴ |
| 8 x 10 ⁷ | 7.6 x 10 ⁴ |
| 2 x 10 ⁸ | 2.5 x 10 ⁵ |

* Se emplearon en la titulación alícuotas del cultivo crecido en presencia de 400 µg por mililitro de la Figura 9.

medio de la bacteria o a una modificación del medio por las bacterias.

Efecto sobre las bacterias revertantes: Simultáneamente con la determinación de bacterias totales descrita en el punto anterior, se siguió también la evolución de las bacterias revertantes en el tubo con AN y en el control (ver Materiales y Métodos).

Tal como se discutiera anteriormente, en el medio de selección de las mutantes se omitieron las trazas de histidina, de esta forma las colonias obtenidas responden a las bacterias His⁺ presentes en el momento en que se tomó la muestra.

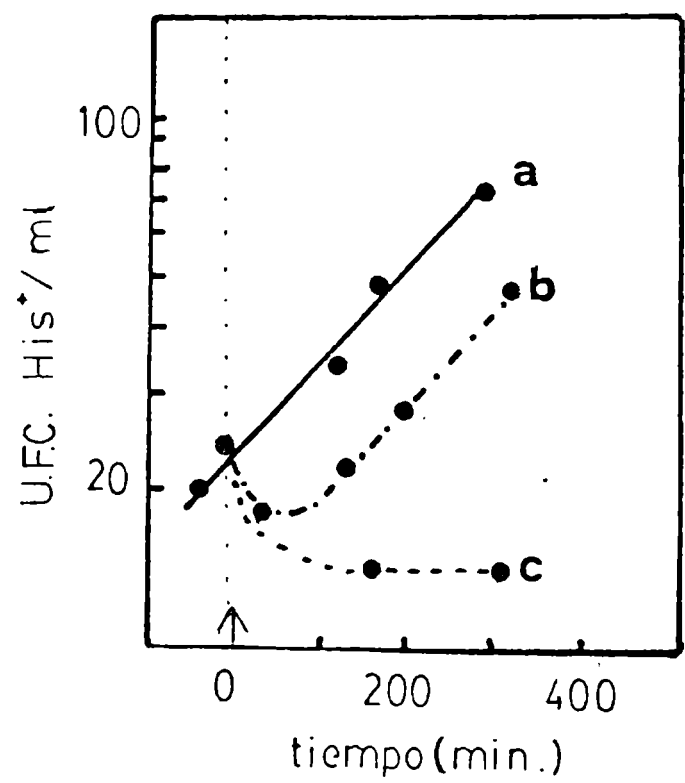
Por medio de este ensayo podemos comparar las revertantes presentes en el tubo problema, antes y después del agregado de la droga. De esta forma si la acción de la misma es inmediata, como en el caso de la MNNG, que describimos anteriormente, se produce un notable aumento de las mutantes en los primeros minutos de contacto.

Al crecimiento normal de las bacterias His⁺, presentes originariamente en el cultivo, se suma la aparición de nuevas revertantes, en las sucesivas generaciones, en virtud de la frecuencia de reversión espontánea. En el caso en que la droga sea mutagénica, el valor de esta frecuencia se verá aumentado y este efecto se pondrá de manifiesto al comparar las curvas obtenidas en estas condiciones con las del control.

En el caso particular del AN las curvas correspondientes aparecen en la Figura 12 y corresponden a la selección de revertantes en la experiencia de la Figura 9. El análisis de los resultados muestra que paralelamente a la disminución inicial, observada para las bacterias totales (en el tubo con AN), el número de revertantes se ve también afectado de forma semejante por

Figura 12

Desarrollo de las revertantes His⁺ de la cepa TA1535 en medio líquido frente a 400 µg/ml de AN



Se midió el desarrollo de las bacterias His⁺ en un cultivo de la cepa TA1535 en medio líquido, en presencia (b) o ausencia (a) de 400 µg/ml de AN. Cuando el cultivo original alcanzó una DO ≈ 0.2 se agregó al tubo experimental el AN y al tubo control el solvente (DMSO). Cada punto de la figura corresponde al valor medio para 6 ≤ n ≤ 10. La curva (c) corresponde a las bacterias His⁺ en presencia de AN cuando el cultivo se mantiene a 40°C durante 15 minutos, previo a la incorporación de la droga.

la incorporación de la droga.

Después de esta disminución inicial la curva de crecimiento de las mutantes en el tubo con AN es prácticamente paralela a la del control. De esta forma no se manifiesta ningún incremento en la frecuencia de mutación para esta cepa.

El crecimiento obtenido parece demostrar que el valor de la frecuencia de mutación espontánea en estas condiciones, es lo suficientemente bajo como para no modificar significativamente el crecimiento normal de las bacterias His⁺ originales y las curvas de crecimiento obtenidas son semejantes a las de las bacterias totales (Figuras 9 y 12).

Cuando las bacterias se encuentran en situación desfavorable (por ejemplo, cuando se las somete a la temperatura de 40°C durante 15 minutos), el valor de revertantes, después de la disminución inicial de viabilidad, no manifiesta modificaciones y se mantiene constante (Figura 12, curva c). Este mismo comportamiento es el que se observó para la población total y que presentamos en la Figura 10.

Los resultados observados muestran que la población total y las revertantes son igualmente sensibles a la acción tóxica de la droga. La letalidad observada se limita a un corto lapso y a una cantidad limitada de bacterias. Este efecto parcial y el restablecimiento del desarrollo de los sobrevivientes en forma similar a los no tratados, no tiene una clara explicación.

Dentro de las limitaciones indicadas, sin embargo, es evidente que el AN no incrementa la frecuencia de reversión espontánea de la cepa en estudio.

8. El AN como droga detoxificable por el sistema

El análisis de los datos de la Tabla 10 y los resultados

de la Figura 9, plantean el interrogante de cómo es posible que las bacterias se adapten en medio líquido, a una dosis de AN que les resulta tan tóxica en la caja. Descartando la hipótesis de que la disminución inicial de viabilidad, en el cultivo líquido, se deba a una selección de fenotipos resistentes al AN (Tabla 12), podemos suponer que de alguna manera las bacterias son capaces de eliminar la toxicidad del medio, una vez transcurridos los primeros 50-70 minutos de contacto.

Para analizar esta hipótesis estudiamos el efecto que el medio supuestamente detoxificado, ejercía sobre un inóculo de bacterias que no había estado previamente en contacto con la droga.

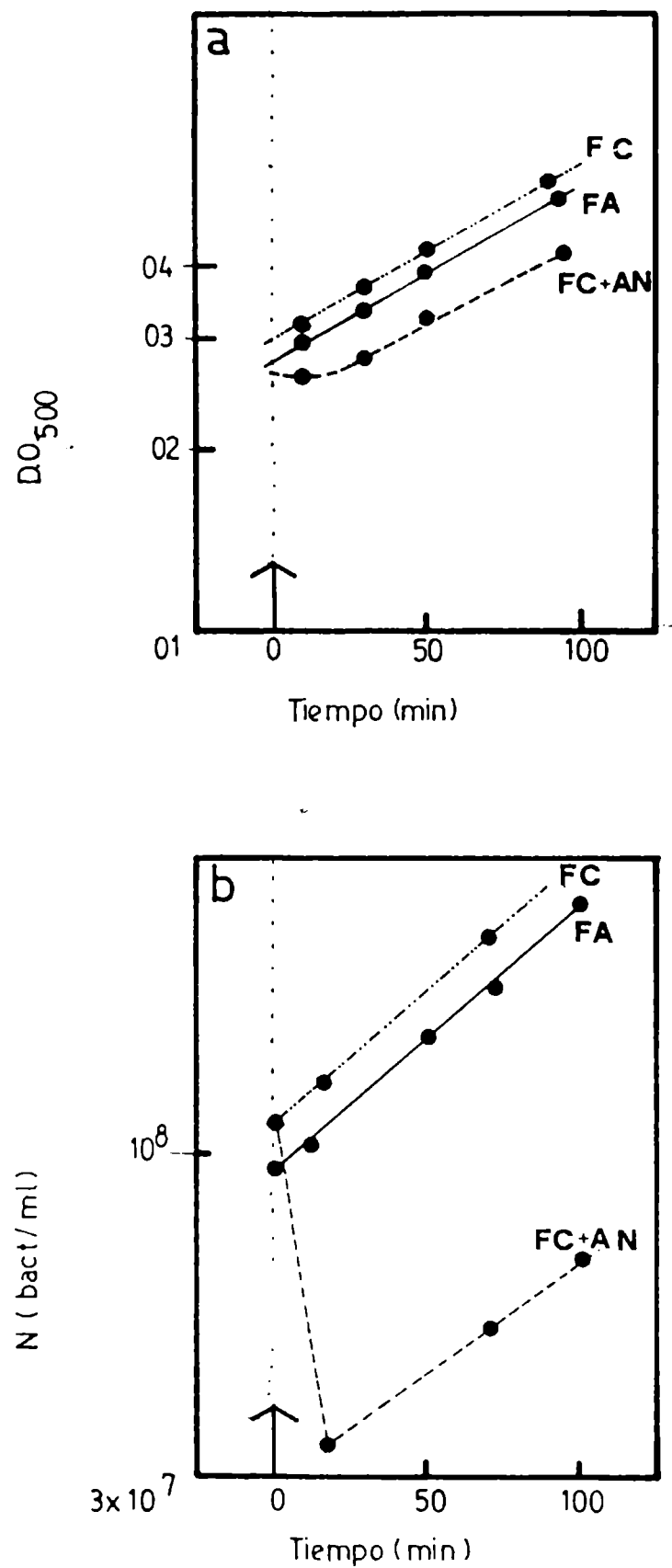
Filtrando el cultivo con AN, obtenido en las condiciones de la Figura 9, obtuvimos el medio FA. De igual manera preparamos a partir del tubo control, el medio FC y para tener un testigo del comportamiento que seguirían las bacterias, en el caso en que la droga permaneciera "inalterada" en el medio, a una alícuota de este filtrado se le incorporó AN hasta una concentración de 400µg por mililitro FC + AN (Ver Materiales y Métodos).

En los tres medios así obtenidos se diluyó un cultivo de la cepa TA1535 en fase logarítmica, de tal forma de obtener una D.O.₅₀₀ de aproximadamente 0.2-0.3 unidades.

Las curvas de crecimiento obtenidas con cada uno de los tres medios se reproducen en la Figura 13. El crecimiento del inóculo en el medio FA no parece ser diferente del obtenido en el medio FC. Como era de esperar, en el medio FC + AN el comportamiento es semejante al presentado en la Figura 9. De esta forma, las bacterias inoculadas en el medio FA no parecen "percibir" la presencia de la droga en niveles que afecten su viabilidad, de modo que nuestros resultados apoyarían la hipótesis de la detoxificación del medio por las bacterias.

Figura 13

Efecto del medio proveniente de un cultivo de la cepa TA1535 crecido en presencia de ácido niflúmico sobre un nuevo inóculo de dicha cepa



Se diluyó 1/5 un cultivo exponencial de la cepa TA1535 en:
FA : medio proveniente de un cultivo de dicha cepa crecido en medio MMHB (ℓ) con 400 µg/ml de AN. FC: medio proveniente de un cultivo control (sin droga); FC + AN : medio proveniente del cultivo control al que se le incorporó AN (400 µg/ml). La $D.O._{500}$ resultante en los cultivos diluidos fue de aproximadamente 0.3 unidades. Cada punto corresponde al promedio de cuatro cajas.

Cuando el medio FA proviene de aquellos cultivos que no consiguen crecer en presencia de droga, se observan los resultados presentados en la Figura 14. El desarrollo seguido por las bacterias en este medio se aproxima más al obtenido en el medio FC + AN, lo que indicaría que las bacterias que no provienen de cultivos exponenciales recientes o que han sido sometidos a temperaturas desfavorables, no serían competentes para detoxificar al AN.

En el capítulo anterior hemos visto que los títulos de los cultivos a partir de los cuales se obtuvo este último medio permanecían constantes en el tiempo, lo que pondría de manifiesto un efecto bacteriostático (Figura 10); pero, a pesar de esto, el medio filtrado conserva el efecto bactericida inicial para el nuevo inóculo (Figura 14). Esto parecería indicar que las bacterias en el cultivo original han modificado muy poco el medio, pero no obstante, han logrado adaptarse a él de forma de conservar su viabilidad a lo largo del tiempo.

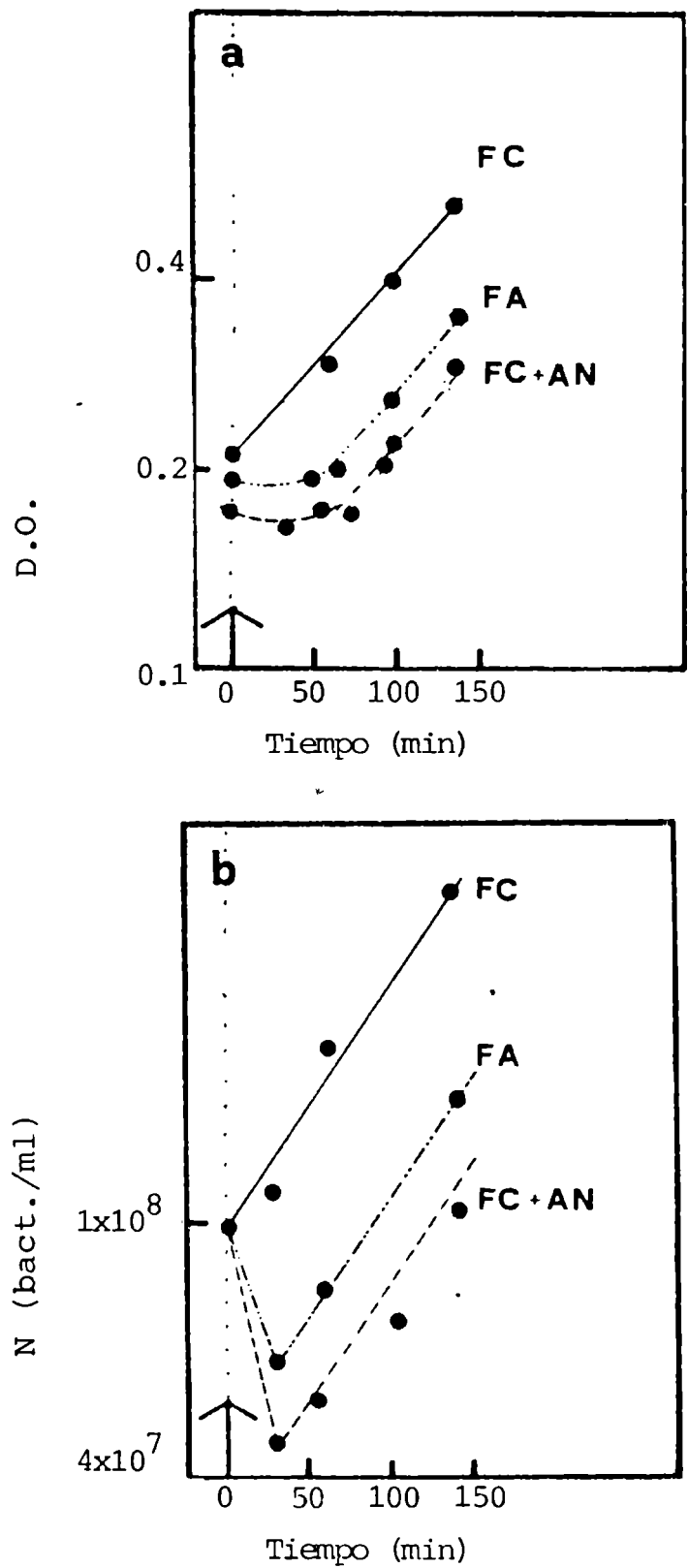
A la luz de los resultados presentados podríamos proponer la inducción de un sistema detoxificante del AN en las bacterias, capaz de eliminar el efecto tóxico del medio.

Esta capacidad parece estar condicionada a cierto estado óptimo de crecimiento de las bacterias. Cuando éstas son "aptas", son capaces de limpiar el medio permitiendo así la evolución normal de los cultivos (ver Discusión).

En el caso de "no aptitud" si bien las bacterias no pueden eliminar la toxicidad del medio, la pérdida de viabilidad inicial culmina en un estado de equilibrio en el cual, si bien no son capaces de duplicarse, los títulos se mantienen en el tiempo.

Figura 14

Efecto del medio proveniente de un cultivo de la cepa TA1535, incapaz de crecer en presencia de ácido niflúmico, sobre un nuevo inóculo



Se realizó una dilución 1/5 de la cepa TA1535 en el medio proveniente de un cultivo de dicha cepa, el que por provenir de un inóculo sobresaturado, fue incapaz de crecer en presencia de 400 µg/ml de AN (FA) . De igual forma se estudió el desarrollo en un medio proveniente del cultivo control (FC) y del control más AN (FC+AN), determinándose en los tres casos la D.O.₅₀₀ (a) y (b) el número de U.F.C./ml en MMHB. Cada punto corresponde al promedio de cuatro cajas.

2. CONCLUSIONES

A partir de la lectura de este capítulo puede concluirse que en el ensayo en medio líquido el AN se comporta como una droga tóxica para la cepa TA1535, pero que las bacterias son capaces de responder a la agresividad del medio eliminando en poco tiempo la toxicidad del mismo. Sin embargo, este tipo de respuesta parece estar dependiendo de una condición metabólica favorable de las bacterias.

Otra conclusión importante que puede extraerse es la carencia de capacidad para producir mutagénesis observada para la droga en estas condiciones (para un análisis más detallado ver Discusión).

DISCUSSION

EFEECTO TOXICO, EFEECTO MUTAGENICO Y CORRECCION POR MUERTE

Antes de intentar un análisis crítico de los resultados obtenidos con el AN, creemos necesario discutir el punto que corresponde a la corrección por muerte en el método de Ames. En la evaluación de este punto es que cobra importancia el trabajo realizado con esta droga.

En general se puede suponer que cuando una droga es tóxica, la pérdida de viabilidad de las bacterias puestas en contacto con ésta, causa una disminución en la oferta de blancos para el posible impacto mutagénico. De esta forma, la comparación con el control no sería representativa ya que en este último caso las bacterias inoculadas no sufren modificación.

Para solucionar este inconveniente Frantz, C.N. y Mallin, H.V., (1975) proponen realizar una preincubación droga-bacteria en medio líquido por espacio de treinta minutos. Transcurrido ese tiempo, los cultivos se diluyen apropiadamente para determinar bacterias totales en medio completo por un lado, y revertantes en medio selectivo con trazas de histidina, por otro (ver Introducción).

Los resultados así obtenidos se expresan entonces como proporción: revertantes/ 10^6 bacterias sobrevivientes.

Este método ha sido empleado por varios autores para determinar comportamiento mutagénico de drogas tales como estreptozotocina y yoduro de povidona (Aiyar, A.S. y Subba Rao, V., 1977; Zimmer, D.M. y Bhuyan, B.K., 1976; Campbell, R.L. y colaboradores, 1978; Rosencranz, H.S. y Poirier, L.A., 1979).

A nuestro criterio, como discutiremos más adelante, el cálculo de la proporción propuesto por estos autores no es representativo si no se conoce la evolución que sigue el inóculo con las trazas de histidina presentes en el medio.

1. INFLUENCIA DE LA FRECUENCIA DE MUTACION EN LA APARICION DE COLONIAS His^+ EN LA CAJA

Según la hipótesis de Luria, S.E. y Delbrück, M. (1943) la velocidad de aparición de mutantes en una población estaría dada por la fórmula:

$$\frac{dn(t)}{dt} = a N(t) \quad (1)$$

De la integración de esta ecuación, considerando el caso hipotético de una única bacteria inicial, se obtiene la ecuación (2), que relaciona el valor final de mutantes en la población al cabo de g generaciones, con el número de bacterias totales:

$$n = a g N \quad (2)$$

donde n es el número de mutantes (que varía en función del tiempo) y N el número total de bacterias que forman la población; a representa la velocidad constante de mutación por bacteria y por generación para una determinada condición, y g el número de generaciones transcurrido, que es función del tiempo.

Para el caso del crecimiento en condiciones normales, es decir sin una presión mutagénica externa, a sería la frecuencia de mutación espontánea.

En el medio sólido con trazas de histidina la situación es algo diferente, ya que la velocidad de crecimiento disminuye a medida que se agota el aminoácido presente. En este caso el número final de bacterias en la población (N) está condicionado a la concentración de histidina disponible. La mayor o menor cantidad de bacterias que se incorporen tendrá influencia en el número de microcolonias obtenido, así como también en el número de generaciones que transcurran en la caja.

Sin embargo, parece existir compensación entre las mutantes que se incorporan inicialmente con cada valor de N_0 y las que

aparecen durante el crecimiento en las cajas, de modo que el número de colonias mutantes observado se mantiene constante cuando el número inicial de bacterias varía entre 10^5 y 10^7 (Salmeen, I. y Durisin, A.M., 1981).

De este análisis surge la importancia que tiene el número final de individuos que forman la pátina de microcolonias sobre el número de revertantes His^+ que aparezcan en esta población. Estas bacterias mutantes serán las que van a dar origen a las colonias mutantes, que son las indicadoras del comportamiento de las drogas probadas.

Sobre los resultados obtenidos tendrán influencia directa la cantidad de aminoácido presente en la caja y el tiempo de duplicación de las bacterias. Este último parámetro puede verse afectado por la droga en estudio.

El no tener en cuenta estos conceptos puede llevar a una evaluación errónea de los resultados. Por ejemplo, un aumento en la concentración de aminoácido en la placa, podría resultar en un aumento de las revertantes obtenidas, ya que como hemos visto, este valor depende del N final alcanzado, y éste está a su vez condicionado a la concentración de aminoácido en el medio. De esta forma, si no se controlan estas variables, es posible atribuir comportamiento mutagénico al agua destilada (Green, M.H.L. y Muriel, W.J., 1976).

2. ENSAYOS CUANTITATIVOS: PREINCUBACION DROGA-BACTERIA EN MEDIO LIQUIDO

Para solucionar el problema de la cuantificación del efecto mutagénico en el sistema de Ames, Janion, C. y Myszkowska, K.(1981) proponen una modificación en el ensayo de preincubación en medio líquido. En este trabajo se prueban varios análogos de purina, incubando los mismos durante treinta minutos con la cepa de *Salmonella*

typhimurium TA1530, pero la selección de revertantes se realiza en un medio en el que se suprimen las trazas de histidina.

En este caso la fracción mutantes/totales es la que corresponde al valor real existente en el medio líquido, después de los 30 minutos de incubación con la droga. Se pone de manifiesto así, para las drogas ensayadas, un incremento en la proporción de mutantes con respecto al control.

Mohn, G.R. y colaboradores (1975) obtienen también resultados positivos con la cepa *Escherichia coli* K12 lys^- , con el mutágeno EMS y las bacterias en fase estacionaria. Según estos resultados, al aumentar el tiempo de preincubación, mejora notablemente la respuesta obtenida.

Con este mismo método se obtienen resultados positivos para los mutágenos dietil-nitrosamina (DENA) y dimetil-nitrosamina (DMNA) con las cepas de *Escherichia coli* gal^- y arg^- en presencia de S-9, confirmando lo observado por Frantz, C.N. y Mallin, H.V. (1975) en la cepa de *Salmonella typhimurium* His G46.

Para estas dos drogas, que son negativas en el ensayo de Ames, queda demostrada la importancia de realizar los ensayos en medio líquido (Mohn, G.R. y colaboradores, 1975).

3. INDUCCION DE LAS MUTACIONES Y SU EXPRESION FENOTIPICA

Una vez que la bacteria ha sido mutagenisada, la expresión fenotípica de esta mutación puede alcanzar distintos grados en el agar selectivo (Witkin, E.M., 1976).

En algunos casos puede requerirse la incubación en condiciones permisivas, después de tratar las bacterias con la droga, para obtener la completa expresión de las mismas (Mohn, G.R. y colaboradores, 1981).

Es así que cuando la cepa de *E. coli* K12 se trata con el

mutágeno epíclorhidrina, la aparición de mutantes Nal^r a dosis "no tóxicas" se incrementa notablemente si se permite la expresión en el medio rico.

Como caso extremo para este mutágeno, cuando la dosis es 10 mM, a medida que se disminuye el tiempo de preincubación, el número de revertantes obtenido en el medio selectivo desciende paulatinamente, de tal forma que para el control (sin preincubación) los valores obtenidos son comparables con los correspondientes a la frecuencia de reversión espontánea.

Dado que no es posible demostrar para esta dosis una disminución de la viabilidad, esto podría atribuirse entonces, a una disminución en el ritmo de duplicación de las bacterias tratadas, y el tiempo de incubación de las cajas no sería suficiente para obtener la completa expresión de las mutaciones. Las pruebas de reextensión realizadas por los autores, confirman la existencia de un período de latencia mayor para las bacterias tratadas, así como también un aumento en el tiempo de duplicación (Mohn, G.R. y colaboradores, 1981).

4. IMPACTO MUTAGENICO Y LETALIDAD

Hasta este punto hemos discutido la corrección por muerte partiendo del concepto de que el efecto tóxico de la droga origina un descenso en el número de blancos. Otro posible mecanismo a tener en cuenta es que el efecto mutagénico se deba a una interacción directa de la droga con el DNA de la bacteria y esta interacción sea la responsable de la toxicidad de la misma.

En apoyo a esta teoría existen trabajos en células de Hamster Chino en las cuales se demuestra que, para varias nitrosaminas hay una relación directa entre la toxicidad y la mutagénesis (Kuroki, T. y colaboradores, 1977).

Según lo reportan varios autores, un gran número de sustancias de probado poder mutagénico forman complejos con el DNA. Podemos citar el caso de la aflatoxina B_1 que se une covalentemente a la guanina, cuando se encuentra bajo la forma de aflatoxina B_1 -8,9 óxido (Coles, B.F. y colaboradores, 1977; Martin, C.N. y Garner, C.R. 1977).

Se ha identificado también para productos metabólicos del benzopireno, obtenidos por incubación con S-9_A, la formación de enlaces covalentes droga-DNA, en este caso afectando la posición N_2 de la deoxiguanina (Santela, R.M. y colaboradores, 1979).

Por otra parte, complejos alquilantes tales como metil-metano-sulfonato y etil-metano-sulfonato, son capaces de transferir sus grupos alquilo al DNA. Las uniones más estables involucran preferentemente al O^6 de la guanina y al O^4 de la timina, siendo la metilación a nivel de la ribosa mucho más lábil (Singer, B., 1976; Singer, B., 1977).

También es bien conocida la formación de dímeros de pirimidina y aún, a dosis más elevadas, de purina que produce la radiación ultravioleta.

Se ha demostrado también la formación de enlaces específicos entre el 4-hidroxi-amino-quinoleína-1-óxido (derivado activo del 4-nitroquinoleína-1-óxido) (4NQO) con las bases guanina y adenina, con formación de enlaces covalentes (Tada, M. y Tada, M., 1976).

Para este último caso en particular se ha encontrado el paralelismo en cuanto a toxicidad y poder mutagénico de esta última droga, con el que corresponde a la radiación U.V.. El daño ocasionado al DNA por el 4NQO podría ser reparado, por lo menos en *E. coli* por un mecanismo similar al de la escisión de los dímeros de timina, tal como lo sugieren las experiencias de Yoshida, S. y colaboradores (1976).

En cualquiera de estos casos cuando la bacteria no puede reparar el daño ocasionado a su material genético, pierde su capacidad para duplicarse. Es además, en la reparación de ese daño que aparecen con probabilidad aumentada las mutaciones (ver Introducción).

Teniendo en cuenta estos conceptos, en estos casos, deberíamos considerar a las bacterias que han perdido su viabilidad, no como una disminución de "oferta" para la acción del mutágeno, sino más bien como el resultado de un impacto múltiple y efectivo del mismo sobre el DNA de la bacteria.

En este caso entonces, el planteo de la corrección por muerte debería ser diferente que en el caso anterior.

Sin embargo, si la droga es tóxica porque es mutagénica, es de esperar que la aparición de mutantes sea sensiblemente mayor que la que corresponde a la reversión espontánea, aún a dosis no tóxicas o ligeramente tóxicas. Entonces, si bien no sería posible una cuantificación del efecto, debería ser posible demostrarlo al menos cualitativamente.

5. GENOTOXICIDAD Y MUTAGENESIS

Por otro lado, tenemos el caso de sustancias tales como el ácido nalidíxico y la novobiocina, que interactúan indirectamente con el DNA afectando su duplicación. Estas drogas se caracterizan por inhibir a la DNA girasa, en distintas subunidades (Cozzarelli, N.R., 1980) y en ambos casos las drogas afectan el complejo DNA-DNA girasa.

Sin embargo, a pesar de la genotoxicidad asociada con estas drogas, no ha sido posible demostrar poder mutagénico cuando se las ensaya en: (Mc Coy, E. y colaboradores, 1980) *Salmonella typhimurium* (aislando mutantes resistentes), *E. coli* PolA⁺/PolA⁻ y *Bacillus*

subtilis $\text{recA}^+/\text{recA}^-$. Es decir que la interacción del ácido nalidíxico y la novobiocina con el DNA no parece alterar la frecuencia de mutación por azar, ni ocasionar daños a nivel del material genético, pasibles de ser reparados.

ENSAYO DE MUTAGÉNESIS EN MEDIO LÍQUIDO: EVALUACIÓN SIMULTÁNEA DE TOXICIDAD Y PODER MUTAGÉNICO

Tal como ha sido planteado, en los casos en que exista solapamiento de los efectos tóxico y mutagénico, surgirá incertidumbre en la interpretación de los resultados obtenidos al aplicar el método de Ames.

Como propuesta para salvar este inconveniente en la evaluación del comportamiento de las drogas, proponemos el ensayo en medio líquido (ver Materiales y Métodos). De esta forma creemos encontrar la solución a algunos de los inconvenientes discutidos anteriormente.

En este ensayo, la droga se incorpora a un cultivo en medio permisivo (MHB-líquido) de la cepa en estudio, cuando éste se encuentra en la fase logarítmica de crecimiento. A distintos tiempos se puede determinar el número de revertantes presentes en este cultivo, sembrando las muestras en un medio en el que sólo las mutantes His⁺ puedan formar colonia (medio MMB). Simultáneamente, es posible establecer también el número total de bacterias, por dilución y recuento en placas con medio permisivo (MMHB).

Tomando muestras antes y después de agregar la droga, se puede evidenciar si la incorporación de la misma tiene influencia sobre la viabilidad de las bacterias (efecto bacteriostático o bactericida), o si causa un aumento en el número de revertantes (efecto mutagénico).

Por otra parte, cualquier modificación en el tiempo de duplicación de los cultivos o en la frecuencia espontánea de aparición de mutantes originada por la presencia de la droga en el medio, se pondrá de manifiesto al comparar el desarrollo de la población en el cultivo experimental con el de un cultivo control, al que se le agrega solamente el diluyente de la droga.

1. EFECTO MUTAGENICO DE MNNG SOBRE LA CEPA TA1535

Para probar la sensibilidad del ensayo en medio líquido seleccionamos el mutágeno MNNG, que no requiere activación metabólica, para inducir mutaciones en la cepa TA1535.

El agregado de esta droga, a una concentración final de 1 µg por mililitro de cultivo, no alteró el ritmo de crecimiento de las bacterias, de manera que a la dosis probada no se manifestó efecto tóxico.

Los resultados obtenidos al estudiar el desarrollo de las bacterias His⁺ en el cultivo experimental y en el cultivo control (sin droga) se reproducen en la Figura 8. A los pocos minutos de agregar la droga, el número de revertantes His⁺ se incrementó aproximadamente 10 veces con respecto a las determinaciones previas, con lo que se puso de manifiesto el marcado efecto mutagénico que esta droga ejerce sobre la cepa TA1535 (curva MNNG).

La evolución posterior de las mutantes en el cultivo con MNNG no muestra diferencias con el crecimiento de esta población en el tubo control ya que las curvas que representan la variación de log bacterias His⁺/ml en función del tiempo, son en ambos cultivos prácticamente paralelas.

Como hemos visto anteriormente, la MNNG actúa como agente metilante del DNA y en el transcurso de esta reacción se consume el mutágeno, al transferir sus grupos metilo a las bases púricas del ácido nucleico y a otros aceptores. En nuestro caso, los resultados obtenidos para la dosis de 1 µg por mililitro de cultivo, sugieren que en los primeros minutos de contacto MNNG-bacteria se consumiría toda la concentración efectiva de droga presente en el medio.

En el Capítulo I presentamos los resultados obtenidos,

siguiendo el método clásico de Ames, al estudiar el comportamiento de la cepa TA1535 frente a esta droga. Tal como puede observarse en la Figura 3a para la dosis de 10 μg de MNNG por caja se obtuvo aproximadamente 2×10^3 revertantes. Este valor representa un incremento aproximadamente 10^2 veces con respecto a los controles, en los cuales el número de colonias His⁺ está determinado por la frecuencia de reversión espontánea de la cepa (15 revertantes por caja). Es necesario resaltar que este punto se encuentra fuera de la relación dosis-respuesta lineal, que se manifiesta para concentraciones menores. Podemos suponer entonces que para la dosis de 10 μg por caja existen otros efectos, como por ejemplo la toxicidad, difícilmente evaluables en esta condición.

En nuestro ensayo de poder mutagénico en medio líquido, con una concentración de 1 μg por mililitro de cultivo, el último punto de la curva MNNG (Figura 8) corresponde a 7×10^3 revertantes por mililitro, lo que representa un incremento también de 100 veces con respecto a la curva control (aproximadamente 70 revertantes por mililitro). En este caso, sin embargo, el resultado estaría determinado exclusivamente por el efecto mutagénico de la droga, con lo que este último dato sería cuantitativamente más significativo.

2. EFECTO DEL ACIDO NIFLUMICO SOBRE LA CEPA TA1535

Durante el estudio del comportamiento de la cepa TA1535 frente a 400 μg de AN por mililitro de cultivo, pudimos comprobar que la presencia de droga en el medio no ejerce efecto mutagénico sobre la población bacteriana. No obstante, la evolución de los cultivos a partir del momento en que se agregaba el AN, planteó interrogantes que en algunos casos tratamos de aclarar

realizando otros experimentos complementarios.

Para facilitar la interpretación de los resultados hemos agrupado nuestros datos bajo dos aspectos: por un lado, la toxicidad de la droga para las bacterias y por otro, la capacidad manifestada por las bacterias (ensayo en medio líquido) y por el S-9 (ensayo en medio sólido) para disminuir esa toxicidad.

Efecto sobre las bacterias totales

Tal como aparece en la Figura 9, al agregar 400 μ g de AN por mililitro a un cultivo en fase logarítmica de la cepa TA1535, un 50-70% de la población pierde su viabilidad durante los primeros 70-90 minutos de contacto droga-bacteria.

Una vez superado este primer período, el resto de la población logra seguir creciendo con un ritmo semejante al del tubo control, al que se le ha agregado solamente el diluyente de AN (DMSO). Esto se pone de manifiesto en la semejanza que presentan las curvas de crecimiento para ambos cultivos, una vez que en el tubo experimental la población bacteriana logra superar el descenso de viabilidad inicial. Por otra parte, en concordancia con los resultados presentados por Maron, D. y colaboradores (1981), al agregar DMSO al tubo control no se observó ninguna modificación en el ritmo de crecimiento, comparado con el correspondiente al de un cultivo en condiciones normales (sin ningún agregado). De esta manera, el efecto observado en el tubo experimental se debería exclusivamente a la presencia de AN en el medio.

Cuando las bacterias que se enfrentan al AN no provienen de cultivos exponenciales recientes, o cuando antes de agregar la droga se las somete a un estado de "stress" por acción de

la temperatura, el comportamiento es diferente al que acabamos de analizar. En estos casos, los resultados obtenidos al incorporar 400 μ g de AN por mililitro de cultivo, son como los representados en la Figura 10. Como se desprende del análisis de las curvas, en estas condiciones, las bacterias no son capaces de desarrollar en presencia de AN.

El estado inicial de las bacterias no impide, sin embargo, el crecimiento del cultivo control. De esta manera, la falta de "aptitud" de las mismas afecta exclusivamente al comportamiento observado en presencia de AN.

Cuando se tomaron diferentes concentraciones de bacterias para enfrentarlas al AN en medio líquido, el número de bacterias que perdieron su viabilidad por acción de la droga mantuvo un valor prácticamente constante ($7-8 \times 10^7$ bacterias/ml) para los tres títulos ensayados. Esta constancia se podría explicar proponiendo una relación estequiométrica entre la concentración de AN presente en el medio y el número de bacterias que pierden su viabilidad por acción de la droga. Esta relación se mantiene, aún para aquellos cultivos que por su historia previa no consiguen crecer en presencia del AN. De esta manera, la letalidad observada no sería el único responsable de la eliminación de la toxicidad del medio.

Al comparar las tres curvas de la Figura 11 se observa que el tiempo empleado por los cultivos para reanudar el crecimiento, después de la incorporación del AN, no manifiesta disminución al aumentar la masa total de bacterias que se enfrentan a la droga. Este período se podría interpretar entonces, como el tiempo necesario para que las bacterias sobrevivientes sean capaces de superar el efecto tóxico del AN.

Efecto del ácido niflúmico sobre las bacterias His⁺

Seleccionando las bacterias mutantes en medio MMB, se estudió paralelamente con la población total, el desarrollo de la población His⁺ en el tubo experimental y en el control.

Como se aprecia en la Figura 12, el efecto tóxico observado para la población total durante los primeros 70-90 minutos de contacto con la droga, se hace sentir de igual manera sobre las bacterias revertantes.

Por otra parte, la semejanza de la evolución seguida por las bacterias His⁺ en el cultivo control y en el cultivo con AN (Figura 12) confirma que la presencia de la droga en el medio, no modifica la frecuencia espontánea de aparición de mutantes de la cepa en estudio.

Un detalle particular del comportamiento de la población mutante en el tubo experimental, es que el nivel de revertantes por mililitro, en el cultivo saturado, se mantiene en valores inferiores a los del cultivo control. Este efecto se observa también para la población total (Figura 9).

En base a esta última observación podríamos explicar la disminución en el número de revertantes para la dosis de 800 µg de AN por caja, en el medio MMA, como consecuencia de la disminución del número final de individuos en la caja. Esto apoyaría la analogía propuesta para ambos sistemas (medio líquido/medio sólido) con las ventajas ya apuntadas a favor del primero.

Cuando por una situación metabólica desfavorable de los cultivos, la droga se comporta como bacteriostática impidiendo el crecimiento de las bacterias (Figura 10), el efecto se manifiesta de igual forma sobre la población His⁺ (Figura 12, curva c), de manera que tampoco en esta condición existen evidencias de que la droga sea un compuesto mutagénico para la cepa TA1535.

Si reunimos ahora los datos discutidos en los puntos anteriores en una evaluación final, podemos afirmar que el AN se comporta como una droga tóxica pero "netamente" no mutagénica, en el sistema en medio líquido.

DETOXIFICACIÓN DEL ÁCIDO NIFLÚMICO

1. DETOXIFICACION "IN VIVO" DEL ACIDO NIFLUMICO POR LAS BACTERIAS

En los resultados discutidos anteriormente, aún no queda claro de qué forma las bacterias son capaces de superar el efecto tóxico inicial del ácido niflúmico en el cultivo.

Una posible explicación de los resultados presentados en la Figura 9, sería que el descenso de viabilidad inicial se deba a una selección de bacterias resistentes al AN. Pero esta afirmación no tendría apoyo en los resultados que presentamos en la Tabla 12: Cuando las bacterias obtenidas a partir de un cultivo creciendo con AN en el medio, se titulan en presencia de la droga, los porcentajes de U.F.C. son comparables con los que muestran aquellos cultivos que no estuvieron previamente en contacto con el AN (Tabla 9).

Cuando, una vez superado el período de latencia inducido por el AN en el cultivo de la Figura 9, se filtra el medio, el desarrollo de un nuevo inóculo en este medio (FA) es el de la Figura 13: El crecimiento de la población en el medio FA es semejante al obtenido en el filtrado del cultivo control de la Figura 9 (FC). Por otra parte, cuando al medio FC se le agrega 400 µg de AN por mililitro (FC + AN), el efecto de este medio sobre las bacterias es el que cabe esperar de acuerdo a los resultados descriptos en el punto anterior. De manera que el desarrollo de un nuevo inóculo en el medio FA estaría demostrando la ausencia de una sustancia tóxica. Con esto se pondría de manifiesto la capacidad de las bacterias en el cultivo original para disminuir la toxicidad del AN, hasta niveles que no afectan su crecimiento.

Cuando el medio FA proviene de aquellos cultivos que no

son capaces de crecer en presencia del AN, el comportamiento de las bacterias en este medio se aproxima más al obtenido en el medio FC + AN (Figura 14). Es decir que en este caso, las bacterias que no logran crecer en presencia de AN, no son capaces de detoxificar el medio en forma efectiva.

Por lo tanto, la capacidad de los cultivos para eliminar la toxicidad del medio externo parece depender de la historia previa de los mismos.

Los resultados discutidos en este punto demostrarían entonces, que las bacterias son capaces de responder a la presencia del AN, generando un sistema enzimático capaz de anular la toxicidad de la droga en el medio externo.

Esta interpretación encuentra apoyo en la descripción de varios sistemas de detoxificación de drogas en bacterias, realizada por otros autores.

En algunos hongos, por ejemplo, se ha evidenciado la presencia de un sistema enzimático que presenta semejanza con el sistema de oxidasas de función mixta de los animales superiores. Es así que en estos microorganismos el citocromo P450 (que actúa como aceptor de electrones) se encuentra unido a membrana, su actividad depende de la presencia de O_2 y NADPH en el medio, y el conjunto cataliza reacciones semejantes a las catalizadas por el sistema análogo de los mamíferos (Smith, R.V. y Rosazza, J.P., 1974).

También en algunas bacterias se ha descrito un sistema enzimático de este tipo, capaz de responder a la inducción con sustancias tales como el fenobarbital y el 3-metilcolantreno, incrementando la concentración intracelular del citocromo P450 (Callen, D.F., 1978). Como hemos visto en la Introducción el pre-tratamiento de las ratas con estas sustancias genera en el hígado una respuesta semejante.

Por otra parte, se ha comprobado actividad mutagénica de varios procarcinógenos cuando éstos actúan en forma directa sobre células vegetativas de *Neurospora crassa* (Ong, T.M. y de Serres, F.J., 1972) y de la Aflatoxina B₁ al actuar sobre una cepa de *Chlamydomonas reinhardtii* (Schimmer, O. y Werner, R., 1974). En los casos citados la transformación de las drogas de promutágenos a mutágenos activos sería realizada por el propio microorganismo.

Recientemente se ha aislado por medio de columnas de intercambio iónico un metabolito formado en la cepa *Salmonella typhimurium* TA1535, a partir de la azida sódica, y se ha comprobado que esta sustancia presenta comportamiento mutagénico (Owais, W.M. y colaboradores, 1981).

Dentro del grupo de drogas detoxificables por las bacterias debemos incluir también a los antibióticos, y dentro de este grupo es importante tener en cuenta el mecanismo de resistencia de algunas bacterias a la penicilina. Esta resistencia está condicionada, a veces, a la síntesis de una enzima capaz de hidrolizar el antibiótico. En estos casos, encontramos algunas características semejantes en el comportamiento de estas bacterias con el observado para la cepa TA1535 en nuestros ensayos con el AN.

En el caso de las cepas Penicilasa⁺ la sensibilidad a la droga puede variar en gran medida con la densidad de la población bacteriana que se enfrenta a la misma: Cuando las bacterias se encuentran separadas en el medio sólido muestran sólo un moderado incremento de la resistencia al antibiótico, si se la compara con la de una cepa sensible (Pen^S). Sin embargo, una cepa más densa de bacterias puede mostrar una diferencia de 10³ veces en el número de bacterias sobrevivientes, con respecto a aquellas cepas que no son capaces de detoxificar al antibiótico

(Moyed, H.S., 1964).

En nuestros ensayos, cuando las bacterias empleadas para la titulación provenían de un cultivo en fase logarítmica, el número de U.F.C. para la dosis de 800 μg de AN por caja, era aproximadamente el 0.5-1% del total obtenido para las cajas sin AN (Tabla 10). Por otra parte, en las cajas con medio MMA sembradas con $2-3 \times 10^7$ bacterias aproximadamente, la pátina de microcolonias para esa dosis de droga, no mostraba diferencias con la de las cajas sin AN. Es decir que la población no parecía verse afectada en este último caso, por un efecto tóxico marcado. La diferencia de comportamiento podría interpretarse como debida a la diferente densidad de la población bacteriana que se enfrenta al AN, en las dos condiciones descriptas.

Apoyados en los conceptos anteriores, la curva de crecimiento obtenida en el ensayo en medio líquido, con la cepa TA1535 y 400 μg de AN por mililitro, se podría interpretar como la resultante de una carrera entre la toxicidad de la droga y la inducción en las bacterias de un sistema capaz de detoxificarla (Figura 9), en el caso que puedan manifestar esa capacidad. Si por el contrario las bacterias no se encuentran en condiciones para detoxificar la droga, después de la carrera inicial sólo serán capaces de conservarse viables en el medio con AN ejerciendo poco o ningún efecto sobre él.

Este último comportamiento podría compararse con el que se observa en las cajas sembradas con un número bajo de bacterias (MMHB), en las que la toxicidad observada para 800 μg de AN por caja, no guarda relación con el desarrollo de la población en el medio MMA y la misma dosis de droga.

En este último caso, al enfrentarse al AN un número mayor de bacterias, se manifiesta la capacidad de las mismas para

detoxificar el medio. De esta manera logran crecer dando una pátina de microcolonias de aspecto semejante al de las cajas sin AN.

2. DETOXIFICACION "IN VITRO" DEL ACIDO NIFLUMICO POR EL EXTRACTO MICROSOMICO

Cuando se determinó el número de U.F.C. en presencia de AN para el total de la población bacteriana (medio MMHB), se observó que la incorporación de S-9 a las cajas disminuía el efecto tóxico de la droga. Es así que el número de U.F.C. obtenido para la dosis de 800 µg de AN por caja resultó mayor cuando las mismas se sembraron agregando el extracto (Figura 7).

En los estudios de poder mutagénico con el sistema Ames/microsomas se ha demostrado que en algunos casos el metabolismo de las drogas catalizado por el S-9 origina una disminución en la respuesta mutagénica, es decir que en estos casos el S-9 transformaría a los compuestos en derivados no mutagénicos. Por ejemplo, en el caso de la azida sódica o del insecticida Captan, que son mutagénicos "per se", la adición de S-9 a las cajas logra bajar significativamente el número de revertantes obtenido (De Flora, S., 1978). También para el caso de algunos derivados de las benzotiopirano-quinoleínas se observó una disminución en la respuesta obtenida, cuando las determinaciones se realizaron con detoxificación (Zimmer, D.M. y Bhuyar, B.K., 1976).

Como hemos visto en la Introducción, el efecto final obtenido al emplear el S-9 Mix para la detoxificación "in vitro" es el resultado del predominio de alguno de los sistemas enzimáticos puestos en juego, cuyos efectos pueden ser antagónicos, así como también de la presencia de sustancias intermediarias o de cofactores (White, T.J. y colaboradores, 1977; Glatt, H.R. y

colaboradores, 1979a).

Cuando se emplea S-9_N en la detoxificación, a una concentración de 50 μ l por mililitro de S-9 Mix, el número de U.F.C. para 800 μ g de AN por caja es mayor que el obtenido en iguales condiciones con S-9_A y S-9₋.

De esta forma, la droga parece ser capaz de inducir en los animales tratados un aumento en los títulos de las enzimas hepáticas involucradas en su propia detoxificación. Esta modificación del contenido enzimático del hígado podría explicar el hecho de que el S-9_N se comporte con efectividad menor que la del S-9₋ (proveniente de animales sin tratamiento) en la detoxificación del mutágeno bromuro de etidio (Figura 7)

Por otro lado, los extractos S-9_A y S-9₋ son también capaces de disminuir la toxicidad del AN en las cajas, con efectividad semejante en ambos casos. Podemos suponer por lo tanto, que el sistema detoxificante de esta droga no es sensible a la inducción con Aroclor y está presente en el hígado de los animales sin tratar (Figura 7a).

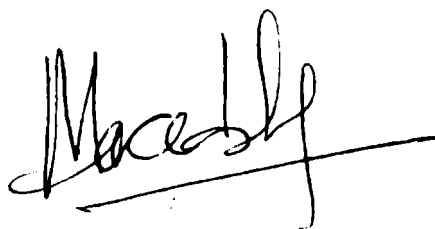
El sistema detoxificante del AN aportado por el S-9 a las cajas podría ser semejante al de las bacterias en medio líquido. Esto no sería sorprendente si se tiene en cuenta que como analizamos anteriormente, se han descrito en bacterias sistemas detoxificantes de drogas semejantes a los de los mamíferos.

Todos estos resultados demostrarían que si bien el AN es una droga tóxica es capaz de inducir su detoxificación, ya sea en las bacterias o en los animales tratados con ella.

CONCLUSIONES

- * La ftalida del ácido niflúmico se comporta como no mutagénica en el sistema Ames/microsomas, con un grado de significación del 0.1%.
- * El ácido niflúmico resulta tóxico para la cepa TA1535 cuando se determina el número de U.F.C. en presencia de droga. Las bacterias son más sensibles a este efecto cuando se encuentran en fase logarítmica de crecimiento.
- * El empleo del ensayo de mutagénesis en medio líquido permite estudiar en forma independiente el efecto tóxico del efecto mutagénico. Con esto, se convierte en una importante herramienta para la evaluación de sustancias que, como el ácido niflúmico, ejerzan efecto letal sobre las bacterias.
- * El estudio del comportamiento de la cepa TA1535 frente al ácido niflúmico, en el ensayo en medio líquido, permitió comprobar que las bacterias son capaces de eliminar la concentración activa de droga en el medio.
- * La capacidad de la cepa TA1535 para detoxificar al AN parece estar condicionada a cierto estado metabólico de las bacterias, ya que esta propiedad se pierde cuando éstas no provienen de cultivos exponenciales recientes, o cuando se obtienen a partir de cultivos conservados a -5°C, o cuando se aumenta la temperatura del cultivo a 40°C durante 15 minutos.

- * De acuerdo a los resultados obtenidos en el ensayo en medio líquido, se concluye que el AN es un compuesto no mutagénico para la cepa en estudio.
- * El extracto microsómico de hígado de rata disminuye la toxicidad del ácido niflúmico cuando se incorpora junto con la droga y las bacterias en el medio MMHB. Se observa en este caso un aumento en el número de U.F.C., con respecto al control (sin S-9).
- * El pretratamiento de las ratas con ácido niflúmico parece inducir en el hígado, las enzimas involucradas en su detoxificación. De esta forma, cuando se emplean 50 μ l de S-9_N por mililitro de S-9 Mix, el número de U.F.C. para 800 μ g de ácido niflúmico por caja, es significativamente mayor que el obtenido con S-9₋ o S-9_A, en las mismas condiciones.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Maceby', with a horizontal line drawn underneath it.

BIBLIOGRAFIA

- Aiyar, A.S. and Subba Rao, V., (1977) Mutation Res. 48, 17-28.
- Alvarez, A.P.; Bickers, D.R. and Kappas, A. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 1321-1325.
- Ames, B.N.; Gurney, E.G.; Miller, J.A. and Bartsch, H. (1972) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69, 3128-3132.
- Ames, B.N.; Lee, F.D. and Durston, W.E. (1973a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 782-786.
- Ames, B.N.; Durston, W.E.; Yamasaki, E. and Lee, F.D. (1973b) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 70, 2281-2285.
- Ames, B.N.; McCann, J. and Yamasaki, E. (1975) Mutation Res. 31, 347-364.
- Ames, B.N. and McCann, J. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 3555-3559.
- Ashby, J.; Styles, J.A.; Anderson, D.; Lefevre, P.A. and Westwood, F.R. (1976) Nature 264, 624-627.
- Ashby, J. and Styles, J.A. (1978) Nature 271, 452-455.
- Barscht, H. (1976) Mutation Res. 38, 177-190.
- Basler, A.; Herbold, B.; Peter, S. and Röhrborn, G. (1977) Mutation Res. 48, 249-254.
- Beije, B.; Jenssen, D.; Arrhenius, E. and Zetterquist, M.A. (1979) Chem. Biol. Interactions 27, 41-57.
- Bjeldanes, L.F. and Chang, G.W. (1977) Science 197, 577-578.
- Butler, W.H.; Greenblatt, M. and Lijinsky, W. (1969) Cancer Res. 29, 2206-2211.
- Caillet Fouquet, P.; Defais, M. and Radman, M. (1978) J. Mol. Biol. 117, 95-112.

Callen, D.F. (1978) Mutation Res. 55, 153-163.

Campbell, R.L.; Supnick, J.D.; Hettrik, J.M. and Nigro, N.D. (1978) Cancer Res. 38, 4585-4590.

Coles, B.F.; Lindsay Smith, J.R. and Garner, C. (1977) Biochem. Biophys. Res. Comm. 76, 888-892.

Coloundre, C. and Miller, J.H. (1977) J. Mol. Biol. 117, 577-606.

Commoner, B.; Vithayathil, A.J. and Henry, J.I. (1974) Nature 249, 850-852.

Commoner, B.; Vithayathil, A.J.; Dolara, P.; Nair, S.; Madyastha, P and Cucca, G.C. (1978) Science 201, 913-916.

Cozzarelli, N.R. (1980) Science 207, 953-960.

Czygan, P.; Green, A.J.; Garro, J.; Hutterer, F.; Schaffner, F.; Popper, H.; Rosenthal, O. and Cooper, D.Y. (1973). Cancer Res. 33, 2983-2986.

De Flora, S. (1978) Nature 271, 455-456.

de Serres, F.J. (1976) Mutation Res. 41, 43-50.

Devoret, R. (1976) en "Origin of Human Cancer", Cold Spring Harbor, H. Hiatt, J. Watson and J. Winsten (Eds) pag. 1451-1472.

Doll, R. (1977) Nature 256, 589-596.

Durstun, W.E. and Ames, B.N. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 737-741.

El-tantawy, M.A. and Hammock, B.D. (1980) Mutation Res. 79, 59-71.

Fahring, R. (1975) Mutation Res. 31, 381-394.

Ficsor, G.; Bordas, S.; Wade, S.M.; Muthiani, E.; Wertz, G.F. and Zimmer, D.M. (1977) Mutation Res. 48, 1-16.

- Fischer, G.A.; Lee, S.Y. and Calabresi, P. (1974) *Mutation Res.* 26, 501-511.
- Floyd, R.A. and Soong, L.M. (1977) *Biochem. Biophys. Acta* 498, 244-249.
- Frantz, C.N. and Malling, H.V. (1975) *Mutation Res.* 31, 365-380.
- Gatehouse, D. (1980) *Mutation Res.* 78, 121-135.
- Generoso, W.M.; Cain, K.T.; Huff, S.W. and Gosslee, D.G. (1977) en "Chemical Mutagens" Hollaender, A. and Serres, F.J. (Eds) 5, 55-77.
- Glatt, H.R.; Ohlsson, A.; Agurell, S. and Oesch, F. (1979a) *Mutation Res.* 66, 329-335.
- Glatt, H.R.; Schwind, H.; Zajdela, F.; Croisy, A.; Jaquignon, P.C. and Oesch, F. (1979b) *Mutation Res.* 66, 307-328.
- Goze, A. and Devoret, R. (1979) *Mutation Res.* 61, 163-179.
- Green, M.H.L. and Muriel, W.J. (1976) *Mutation Res.* 38, 3-32.
- Green, M.H.L. (1978) *Arch. Toxicol.* 39, 241-248.
- Guttenplan, J.B. (1979) *Mutation Res.* 64, 91-94.
- Hartman, P.E.; Levine, K.; Hartman, Z. and Berger, H. (1971a) *Science* 172, 1058-1060.
- Hartman, P.E.; Hartman, Z.; Stahl, R.C. and Ames, B.N. (1971b) *Adv. in Genetics* 16, 1-34.
- Haveland Smith, R.V. (1981) *Mutation Res.* 91, 285-290.
- Herbold, B. and Buselmaier, W. (1976) *Mutation Res.* 40, 73-84.
- Hsu, W.T.; Moohr, J.W. and Weiss, S.B. (1965) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 53, 517-524.

Huberman, E. and Sachs, L. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 188-192.

Iqbal, Z.M.; Varnes, M.E.; Yoshida, A. and Epstein, S.S. (1977) Cancer Res. 37, 1011-1015.

Janion, C. and Myszkowska, K. (1981) Mutation Res. 91, 193-197.

Kada, I.; Tutikawa, K. and Sadaie, Y. (1972) Mutation Res. 16, 165-174.

King, M.T.; Beikirch, H.; Eckhardt, K.; Gocke, E. and Wild, D. (1979) Mutation Res. 66, 33-43.

Korbelik, M. and Horvat, D. (1980) Mutation Res. 78, 201-207.

Kurelec, B.; Matijasevic, Z.; Rijavec, M. Alacevic, M.; Britvic, S.; Müller, W.E.G. and Zahn, R.K. (1979) Bull. Environm. Contam. Toxicol. 21, 799-807.

Kuroki, T.; Drevon, C. and Montesano, R. (1977) Cancer Res. 37, 1044-1050.

Langer, P.J.; Shanabruch, W.G.; Walker, G.C. (1981) J. Bacteriol. 145, 1310-1316.

Lee, K.; Gold, B. and Mirvish, S.S. (1977) Mutation Res. 41, 131-138.

Levin, D.E.; Blunt, E.L.; Levin, R.E. (1981) Mutation Res. 85, 309-322.

Levine, A.; Moreau, P.; Sedwick, S.; Devoret, R.; Adhya, S.; Gottesman, M. and Das, A. (1978) Mutation Res. 50, 29-35.

Luria, S.E. and Delbrück, M. (1943) Genetics 28, 491-511.

Mac Phee, D.G. (1973) Appl. Microbiol. 26, 1004-1005.

Maier, P. and Schmid, W. (1976) Mutation Res. 40, 325-338.

- Malaveille, C.B.; Tierney, B.; Grover, P.L.; Sims, P. and Bartsch, H. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 75, 427-433.
- Martin, C.N. and Garner, C.R. (1977) Nature 267, 863-865.
- Maron, D.; Katzeneellen, J.B. and Ames, B.N. (1981) Mutation Res. 89, 343-350.
- Matter, B.E. (1976) Mutation Res. 38, 243-258.
- McCann, J.; Spingarn, N.E.; Kobori, J. and Ames, B.N. (1975a) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 979-983.
- McCann, J.; Choi, E.; Yamasaki, E. and Ames, B.N. (1975b) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 5135-5139.
- McCann, J. and Ames, B.N. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 950-954.
- Mc Coy, E.C.; Petřullo, L.A. and Rosencranz, H.S. (1980) Mutation Res. 79, 33-43.
- Mc Coy, E.C.; Rosencranz, E.J. and Rosencranz, H.S. (1981) Mutation Res. 90, 11-20.
- Mc Gregor, J.T. and Johnson, I.J. (1977) Mutation Res. 48, 103-108.
- Mizusaki, S.; Takashima, T. and Tomaru, K. (1977) Mutation Res. 48, 29-36.
- Mohn, G.R.; Ellenberger, J.; Mc Gregor, D. and Merker, H.J. (1975) Mutation Res. 29, 221-233.
- Mohn, G.R. (1977) Archives of Toxicology 38, 109-133.
- Mohn, G.R.; Guijt, N. and Glickman, B.W. (1980) Mutation Res. 74, 255-265.
- Mohn, G.R.; Kerklaan, P.; de Knijf, P. and Bouter, S. (1981) Mutation Res. 91, 419-425.

- Montesano, R. and Barsth, H. (1976) Mutation Res. 32, 179-228.
- Moreau, P.; Bailone, A. and Devoret, R. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 75, 410-414.
- Moyed, H.S. (1964) Ann. Rev. Microbiol. 18, 347-352.
- Nagao, M.; Sugimura, T. and Matsushima, T. (1978) en "Annual Review of Genetics" H.L. Roman, A. Campbell and L.M. Sandler (Eds) 12, 117-159.
- Newbold, R.F. and Brookes, P. (1976) Nature 261, 52-54.
- Nishioka, T. (1975) Mutation Res. 31, 185-189.
- Ogawa, T.; Wabiko, H.; Tsurimoto, T.; Horii, T. and Masukata, H. (1979) en "Cold Spring Harbor Symposia of Quantitative Biology", Cold Spring Harbor Laboratory 43, 1310-1316.
- Ong, T.M. and de Serres, F.J. (1972) Cancer Res. 32, 1890-1893.
- Painter, R.B. (1977) Nature 265, 650-651.
- Purchase, I.F.H.; Longstaff, E.; Ashby, J.; Styles, J.A.; Andersen, D. Lefevre, P.A. and Westwood, F.R. (1976) Nature 264, 624-627.
- Rinkus, S.J. and Legator, M.S. (1979) Cancer Res. 39, 3289-3318.
- Rosenkranz, H.S.; Gutter, B. and Speck, W.T. (1976) Mutation Res. 41, 61-70.
- Rosenkranz, H.S. and Poirier, L.A. (1979) J. Natl. Cancer Inst. 62, 873-892.
- Salhab, A.S. and Edwards, G.S. (1977) Cancer Res. 37, 1016-1021.
- Salmeen, I. and Durisin, A.M. (1981) Mutation Res. 85, 109-118.
- Santella, R.M.; Grunberger, D. and Weinstein, B.I. (1979) Mutation Res. 61, 181-189.

- Schimmer, O. and Werner, R. (1974) Mutation Res. 26, 423-425.
- Schmid, W. (1975) Mutation Res. 31, 9-15.
- Sedwick, S.G. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 72, 2753-2757.
- Seeberg, E.; Nissen-Meyer, J. and Strike, P. (1976) Nature 262, 524-526.
- Seino, Y.; Nagao, M.; Yahagi, T.; Hoshi, A.; Kawachi, T. and Sugimura, T. (1978) Cancer Res. 38, 2148-2156.
- Shirashu, Y.; Morisha, M.; Kato, K.; Furashi, A. and Kada, T. (1976) Mutation Res. 40, 19-30.
- Sims, P.; Grover, P.L.; Swaisland, A.; Pal, K. and Hewer, A. (1974) Nature 252, 326-328.
- Singer, B. (1976) Nature 264, 333-339.
- Singer, B. (1977) J. Toxicol. Environm. Health 2, 1279-1295.
- Sirover, M.A. and Loeb, L.A. (1976) Science 194, 1434-1436.
- Slater, E.E.; Anderson, M.D. and Rosenkranz, H.S. (1971) Cancer Res. 31, 970-973.
- Smith, R.V. and Rosazza, J.P. (1974) Arch. Biochem. Biophys. 161, 551-558.
- Stark, T. and Wogan, G. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 1343-1347.
- Stolz, D.R.; Poirier, L.A.; Irving, C.C.; Stich, H.F.; Weisburger, J.H. and Grice, H.C. (1974) Toxicol. Appl. Pharmacol. 29, 157-180.
- Sugimura, T. (1978) Mutation Res. 55, 149-152.
- Swenson, D.; Miller, E.C. and Miller, J.A. (1977) Cancer Res. 37, 172-181.

- Tada, M. and Tada, M. (1976) *Biochem. Biophys. Acta* 454, 558-566.
- Tamura, G.; Gold, C.H.; Ferro-Luzzi, A. and Ames, B.N. (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77, 4961-4965.
- Tanooka, H. (1977) *Mutation Res.* 42, 19-32.
- Tatsumi, K. and Nishioka, H. (1977) *Mutation Res.* 48, 195-204.
- Tokiwa, H.; Morita, K.; Takeyoshi, H.; Takahashi, K. and Ohnishi, Y. (1977) *Mutation Res.* 48, 273-278.
- Tokiwa, H.; Nakagawa, R. and Onishi, Y. (1981) *Mutation Res.* 91, 321-325.
- Tong-man, O.; Callen, D.F.; Huang, S.L.; Batzinger, R.P. and Bueding, E. (1977) *Mutation Res.* 48, 37-42.
- Toshio, K.; Drevon, C. and Montesano, R. (1977) *Mutation Res.* 37, 1044-1050.
- Tsuyoshi, K. and Yamamoto, H.A. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 415-419.
- Walker, G.C. (1979) en "Cold Spring Harbor Symposium of Quantitative Biology", Cold Spring Harbor Laboratory 43, 893-896.
- Weisburger, J.A. and Weisburger, E.K. (1973) *Pharmacol. Rev.* 25, 1-66.
- Wendel, L.N. and Snorri, S.T. (1976) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 71, 1201-1206.
- Wheeler, L.; Halula, M. and Demeo, M. (1981) *Mutation Res.* 83, 39-48.
- White, T.J.; Goodman, D.; Shulgin, A.T.; Castagnoli, Jr.N.; Lee, R. and Petrakis, N.L. (1977) *Mutation Res.* 56, 199-202.
- Williams, G.M. (1977) *Cancer Res.* 37, 1845-1851.
- Williams, G.M.; Mori, H.; Hirono, I. and Nagao, M. (1980) *Mutation Res.* 79, 1-5.

Witkin, E.M. (1976) Bacteriol. Rev. 40, 869-877.

Wogan, G.N.; Edwards, G.S. and Newberne, P.N. (1971) Cancer Res. 31, 1936-1942.

Wong, J.J.; Singh, R. and Hsieh, D.P.H. (1977) Mutation Res. 44, 447-450.

Woogd, C.E.; Vander Stell, J.J. and Jacobs, J.J. (1981) Mutation Res. 89, 269-282.

Yahagi, T.; Nagao, M.; Hara, K.; Matsushima, T.; Sugimura, T. and Bryan, G.T. (1974) Cancer Res. 34, 2266-2273.

Yahagi, T.; Nagao, M.; Seino, Y.; Matsushima, T.; Sugimura, T. and Kada, M.O. (1977) Mutation Res. 48, 121-129.

Yoshida, S.; Tada, M. and Tada, M. (1976) Nucleic Acid Res. 3, 3227-3233.

Yoshikawa, K.; Isobe, M.; Watabe, T. and Takabatake, E. (1980) Mutation Res. 78, 219-226.

Young, P.R. and Kallenbach, R.N. (1981) J. Mol. Biol. 145, 785-813.

Young, P.R.; Marfey, P. and Kallenbach, R.N. (1981) Mutation Res. 90, 1-10.

Zimmer, D.M. and Bhuyan, B.K. (1976) Mutation Res. 40, 281-288.